

LE BIOFILM DE *BACILLUS SUBTILIS* :
UN ÉLÉMENT CENTRAL DANS LA GESTION DE SON HOMÉOSTASIE DU FER

par

Adrien Rizzi

Thèse présentée au Département de chimie en vue
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

Janvier 2020

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada

Le 22 Janvier 2020

Le jury a accepté la thèse de monsieur Rizzi Adrien dans sa version finale

Membres du jury

Professeur Jean-Philippe Bellenger

Directeur de recherche

Département de chimie

Professeur Pascale B. Beauregard

Codirectrice de recherche

Département de biologie

Professeur Sébastien Roy

Codirecteur de recherche

Département de biologie

Professeur Philippe Constant

Évaluateur externe

Centre Armand-Frappier santé biotechnologie (Laval, QC)

Professeur François Malouin

Évaluateur interne

Département de biologie

Professeur Pedro Segura

Évaluateur interne

Département de chimie

Professeur Claude Legault

Président-rapporteur

Département de chimie

SOMMAIRE

Le fer est un des éléments les plus importants pour les organismes vivants. Très abondant dans le sol et pourtant peu biodisponible il est devenu une ressource stratégique pour la majorité des organismes, dont les bactéries, car il est impliqué dans de nombreux processus biologiques comme co-facteur métallique d'enzymes. Au cours de l'évolution, les bactéries ont développé diverses stratégies afin d'acquérir cet élément de leur environnement. L'une de ces stratégies est la sécrétion de molécules de faible poids moléculaire à forte affinité pour le fer : les sidérophores. Les sidérophores ont été souvent étudiés dans un contexte de culture en suspension sous agitation pour expliquer leur fonctionnement. Il a été montré que leur efficacité peut être influencée par divers paramètres physico-chimiques comme le pH, le degré d'oxydation du fer et si ce dernier est complexé ou non par des molécules organiques et des particules minérales.

La majorité de ces études n'ont pas été conduites dans le cadre d'une culture bactérienne en biofilm, qui représente pourtant le mode de vie naturel de 87% des microorganismes. Les biofilms peuvent exhiber certaines des propriétés pouvant influencer l'efficacité des sidérophores comme des gradients de pH, des gradients de potentiel d'oxydoréduction ou encore la capacité de la matrice du biofilm à immobiliser des métaux. Bien qu'il y ait un certain nombre d'études sur la relation entre la production de sidérophores et la formation de biofilm, l'importance de leurs interactions sur l'homéostasie du Fe des microorganismes reste peu étudiée.

Afin d'étudier le rôle de la production de biofilm et de sidérophore sur l'homéostasie du Fe, nous avons utilisé la bactérie à Gram positif *Bacillus subtilis* NCIB 3610, pour laquelle la formation de biofilm et la sécrétion de sidérophores sont bien caractérisées. Nous avons tout d'abord développé une méthode permettant la caractérisation des contenus intracellulaires en métaux et la quantification de la densité cellulaire de colonie bactérienne dans des biofilms au cours de la croissance. Grâce à cette méthode, combinée à l'utilisation de traceurs isotopiques du fer et divers mutants de *B. subtilis*, nous avons démontré dans un premier temps qu'en culture statique les sidérophores et la matrice extracellulaire du biofilm bactérien sont tous les deux nécessaires pour l'acquisition du fer, le maintien de l'homéostasie et la croissance de la bactérie. Dans un second temps, nous avons montré que le fer piégé dans le biofilm était mobilisable partiellement ($12\% \pm 5\%$), sans aucun apport extérieur, afin de soutenir une partie de la croissance de *B. subtilis*. Finalement, nous avons observé que la bactérie peut moduler son utilisation de ce Fe associé au biofilm en fonction de sa capacité à acquérir du fer du milieu extérieur.

Les résultats présentés lors de cette étude démontrent que le biofilm est un acteur majeur dans le processus d'acquisition et d'homéostasie du fer chez *B. subtilis*. Ces résultats invitent également à réévaluer le rôle des biofilms qui représentent le mode de vie majoritaire dans la nature des microorganismes et qui jouent un rôle central dans les cycles des micronutriments dans divers domaines de recherche allant de l'environnement au biomédical.

Mots Clés : fer, biofilm, sidérophores, homéostasie, *Bacillus subtilis*

REMERCIEMENTS

Je suis en bas des escaliers, la dernière ligne droite d'un long chemin qui mène à la fin de la thèse et mes pensées et mes remerciements iront tout d'abord à mes directeurs de thèse, les Professeurs Pascale B. Beauregard, Sébastien Roy et surtout Jean-Philippe Bellenger, qui a su me guider et me pousser à me remettre en question dans le but de m'améliorer. Ces années passées ont été l'occasion de me perfectionner sur un plan scientifique dans de nombreux domaines de la chimie analytique et la biologie, mais également sur un plan plus personnel en me laissant chercher et essayer de trouver la méthodologie qui me correspondait le mieux, notamment dans le domaine de l'écriture.

Je souhaiterais remercier les membres de mon jury ; le prof. Philippe Constant qui a accepté de relire et d'évaluer ma thèse, le prof. Claude Legault qui a été le président à la fois de mon jury et de mon comité d'encadrement, le prof. Pedro Segura pour son expérience en chimie analytique, ainsi que le prof. François Malouin qui a accepté de faire partir de mon jury en tant que membre expert.

Je souhaite remercier tous les membres du département de chimie et de biologie de l'Université de Sherbrooke, qui m'ont apporté une aide précieuse lors de ma recherche comme René Gagnon et Philippe Venne pour tout ce qui a trait à la chimie analytique et Daniel Garneau pour la microscopie et pour m'avoir formé sur le FACS Jazz.

Je remercie également Solange Thériault et Jean-Marc Chapuzet pour leur soutien administratif et le prof. Gessie Brisard pour sa relecture quant à la forme de ce manuscrit.

Je remerciais ensuite tous mes camarades du laboratoire Bellenger et Beauregard. Les anciens comme Romain Darnajoux et Lounes Haroune avec qui les discussions scientifiques au bord d'une paillasse ou au détour d'un couloir étaient très intéressantes et constructives. Les moins anciens ayant fini comme Pauline Lemonier, Frédéric Lecuyer et Maude Thérien avec qui je m'entendais très bien et avec qui j'ai toujours eu plaisir à discuter au laboratoire ou en dehors lors de repas ou de sorties sportives. Et enfin, les nouveaux qui font poursuivre les expériences et la vie du laboratoire à qui je souhaite le meilleur. Je suis à la moitié de ces escaliers et maintenant je vais sortir du professionnel.

Je remercie avant tout mes anciens professeurs, Pépin Christine, Polidori Ange, Durand Gregory et Mora-Soumille Nathalie, car c'est vous qui m'avez formé et permis d'atteindre finalement cette thèse. Je remercie également mes comparses de l'époque avec qui j'ai partagé tant de bons souvenirs de paillasse ou de trajets jusqu'à l'Université de Marseille.

Parmi vous tous, j'aimerais plus particulièrement remercier et dédier cette thèse à la mémoire de Loïc Affagard, sans doute mon meilleur ami de la faculté, un camarade fidèle dans le laboratoire et en dehors. J'aurais aimé finir quelques mois plus tôt pour que tu puisses être là pour cette soutenance.

Je voudrais remercier mon père, Valeriano Rizzi et ma mère Ginette Gouthière pour votre soutien et toutes ces visites annuelles qui m'ont permis de m'évader pour quelques semaines du travail. Mon frère Florian Rizzi pour nos discussions post-match apocalyptique de l'Italie ou du Milan AC.

Alors qu'il ne me reste plus que quelques pas pour franchir la porte de la salle de soutenance mes dernières pensées vont aux deux êtres qui me sont les plus chers au monde. Ceux partageant mes journées avec leur bonne humeur, mais également qui illuminaient ceux qui sont sombres, car les expériences ne fonctionnaient pas. Les mots seraient simplement superflus, car pas assez forts. Vous m'avez et vous continuerez tant à m'apporter, ce travail est aussi le vôtre, à vous Elodie ma femme et Alessio mon fils.

Maintenant, il est temps, une dernière pensée pour les organismes canadiens de subvention de la recherche comme la FRQNT (le fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies) ainsi que la chaire de recherche du Canada qui ont permis à ces recherches d'exister.

J'ouvre enfin la porte et place à la science.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	III
REMERCIEMENTS	V
TABLE DES MATIERES	VII
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1. MISE EN CONTEXTE GENERALE	4
1.1. L'importance du fer pour les microorganismes	4
1.2. Les sidérophores	5
1.2.1. Généralités.....	5
1.2.2. Les sidérophores de <i>Bacillus subtilis</i>	7
.....	9
1.3. Les biofilms	10
1.3.1. Généralité sur les biofilms.....	10
1.3.2. Le biofilm de <i>Bacillus subtilis</i>	11
1.3.3 Les composants majeurs du biofilm de <i>Bacillus subtilis</i>	12
1.3.4. Complexation des métaux	12
.....	13
1.4. La notion d'homéostasie métallique	14
.....	15
1.5. Questions de recherche :	16
CHAPITRE 2. MATERIELS ET METHODES	18
2.1. Notes préliminaires	18
2.2. Bactérie modèle et milieu de culture	18
2.2.1. Choix de <i>Bacillus subtilis</i>	18
2.2.2. Milieux de culture	20
2.2.3 Microscopie à fluorescence :	20
2.3. Quantification de la production de biofilm par cytométrie de flux:	21
2.4. Analyses élémentaires :	21

2.4.1. La digestion oxydative des échantillons :.....	21
2.4.2. Quantification par ICP-MS	21
2.5. Analyses des sidérophores :.....	24
2.5.1. Traitement de la verrerie :	24
2.5.2. Extraction des sidérophores :	24
2.5.3. Quantification par UPLC-MS/MS.....	25
CHAPITRE 3. METHODES D'ISOLEMENT DES CELLULES BACTERIENNES DE LA MATRICE D'UN BIOFILM ET LEURS QUANTIFICATIONS.....	27
3.1. Notes préliminaires :.....	27
3.2. Introduction :.....	27
3.3. Méthode d'isolement et le lavage des cellules :	29
3.3.1. Protocole :.....	29
3.3.2. Validation de la méthode :.....	30
3.3.2.1. <i>La solubilisation de la matrice</i> :	30
3.3.2.2. <i>La lyse cellulaire</i> :	31
3.4. Quantification des cellules:.....	33
3.5. Conclusion :	34
CHAPITRE 4 : L'HOMEOSTASIE DU FER CHEZ BACILLUS SUBTILIS REQUIERT LA PRODUCTION DE SIDEROPHORES MAIS AUSSI LA FORMATION DE BIOFILM.....	36
4.1. Avant-propos :	36
4.1.1. Auteurs et affiliations :.....	36
4.1.2. Présentation de l'article	36
4.1.3. Contribution de chaque auteur	37
4.2. Article: Iron Homeostasis in <i>Bacillus subtilis</i> requires siderophore production and biofilm formation.....	38
4.2.1. Abstracts :.....	38
4.2.2. Importance :.....	38
4.2.3. Introduction:	39
4.2.4. Matériels et méthodes :.....	40
4.2.4.1. <i>Strains and mutant construction</i> :.....	40
4.2.4.2. <i>Preculture and biofilm formation</i> :	41
4.2.4.3. <i>Cells isolation and analysis</i> :.....	41
4.2.4.4. <i>PtapA-yfp reporter and flow cytometry analysis</i> :.....	41
4.2.4.5. <i>Elemental analysis</i> :.....	42

4.2.4.6. Siderophore extraction and quantification:	42
4.2.4.7. Fe complexation by the catechol siderophores:	42
4.2.4.8. Statistical analysis:	43
4.2.5. Results:	43
4.2.5.1. Biofilm formation, siderophore production, and Fe homéostasies.....	43
4.2.5.2. Siderophores and biofilm are both required to sustain bacterial growth and Fe acquisition.....	46
.....	49
4.2.5.3. Biofilm formation contributes to the siderophore-mediated uptake of Fe.....	49
4.2.5.4. Complexation of Fe by catechol siderophores and Fe-siderophore complex acquisition efficiency.	51
4.2.6. Discussions :.....	52
4.2.7. Acknowledgments :.....	54
CHAPITRE 5: BACILLUS SUBTILIS MODULE SON UTILISATION DU FER LIES A SA MATRICE EN FONCTION DE LA BIODISPONIBILITE DU FER DANS LE MILIEU	55
5.1. Avant-propos :	55
5.1.1. Auteurs et affiliations :	55
5.1.2. Présentation de l'article	55
5.1.3. Contribution de chaque auteur	56
5.2. Bacillus subtilis modulates its usage of biofilm-bound iron in response to environmental iron availability	57
5.2.1. Abstract:	57
5.2.2. Introduction :	57
5.2.3. Methods:.....	58
5.2.3.1. Strains, isotopic labeling of cells and biofilm.....	58
5.2.3.2. Cells isolation and Fe analysis.....	59
5.2.3.3. Fe complexation by bacillibactin.....	60
5.2.3.4. Statistical analysis	60
5.2.4. Results	60
5.2.4.1. Quantification of iron concentration in Bacillus subtilis biofilm matrix.....	60
5.2.4.2. Mobilization of biofilm-bound Fe by B. subtilis	61
5.2.4.3. Effect of environmental Fe on the acquisition of biofilm-bound Fe.....	64
Efficiency of bacillibactin to compete with hydroxide and tannic acid for Fe	64
5.2.5. Discussion	65
5.2.6 Acknowledgment.....	68
REFERENCES ET NOTES	72

ANNEXE : INFORMATION COMPLEMENTAIRES DE DE RIZZI ET AL 2019 ⁸⁰	78
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ATP	Adénosine-triphosphate
BB	Bacillibactine
BB-Fe	Bacillibactine complexé au fer
DefE	Desferrioxamine E
DHBA	acide 2,3-dihydroxybenzoïque
EDTA	Ethylène diamine tétra acétique acide
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> ou tri cellulaire induit par fluorescence
Fe	Fer
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy</i> ou spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif
LB	Milieu de culture Luria-Bertani
Msgg	Milieu de culture pour <i>Minimum Salt Glutamate and Glycerol</i>
PF	Paraformaldéhyde
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
Uv-VIS	Spectroscopie Ultraviolet-Visible
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i> ou protéine fluorescente jauneC

.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Description des souches de <i>B. subtilis</i> employées lors de ce projet.....	19
Tableau 2 : Composition du milieu minimal MSgg sans fer.....	20
Tableau 3 : Caractéristiques des méthodes analytiques élémentaires employées.....	22
Tableau 4 : Descriptions de la courbe d'étalonnage mixte métaux.....	23
Tableau 5 : Descriptions de la courbe d'étalonnage phosphore/fer	23
Tableau 6 : Description de la méthode d'élution employée pour la séparation et la quantification des sidérophores BB et DHBA.....	25
Tableau 7 : Paramètres de la source utilisés pour la quantification des sidérophores BB et DHBA	26
Tableau 8 : Résultats des tests CAS, Arnow et la présence d'agrégats cellulaires vérifiés par microscopie optique. (-) absence, + (présence), ++ (présence fortement positive), +++ (présence extrêmement positive).....	31

LISTE DES FIGURES

Fig.1. Schémas du modèle classique de répression par Fur des gènes impliqués dans la synthèse de sidérophores. Inspiré et modifié de Troxell et Hassan 2013	5
Fig.2. Six grandes familles de sidérophores. Les cadres bleus sont les fonctions responsables de la complexation du fer.....	7
Fig.3. Structure de la bacillibactine produite par <i>Bacillus subtilis</i>	8
Fig.4. Opéron encodant les enzymes de la synthèse de la bacillibactine et DHBA chez <i>Bacillus subtilis</i> 9	
Fig.5. Les 4 transporteurs de type ABC du fer chez <i>Bacillus subtilis</i> . Extrait de (Ollinger et al) 2006 ³⁷ 9	
Fig.6. Colonisation d'une racine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par <i>Bacillus subtilis</i> 3610 P _{tapA} -yfp exprimant une protéine fluorescente quand sous forme de biofilm observé par microscope à fluorescence (Rizzi Adrien 2016, non publiée).....	10
Fig.7. Voie d'activation des opérons <i>epsA-O</i> et <i>tapA-sipW-tasA</i>	11
Fig.8. Distribution spatiale du Fe ²⁺ (vert) et Fe ³⁺ (rouge) dans un biofilm isolé de rivière. Résultats extraits de Dynes et al ⁵¹	13
Fig.9. Schémas illustrant le principe de l'homéostasie	14
Fig.10. Schémas illustrant les 3 paramètres majeurs influençant l'homéostasie	15
Fig.11. Schémas illustrant la cinétique d'internalisation du fer. K _{in} est la constante d'internalisation du fer, K _f la constante de formation du complexe sidérophore-fer, et K _d la constante de dissociation du complexe sidérophore-fer.....	16
Fig 12. Figure extraite des informations supplémentaires de Rizzi <i>et al.</i> (2019). Concentration cellulaire en Fe, Mn et Mg de la souche sauvage de <i>Bacillus subtilis</i> (WT) après divers traitements : (A) Cellules fixées, (B) cellules fixées et soniquées, et (C) cellules fixées, soniquées et traitées au NaOH. Les données ont été rapportées en mol.cell ⁻¹	32
Fig 13. Figure extraite des informations supplémentaires de Rizzi <i>et al.</i> (2019). Régression linéaire entre le phosphore intracellulaire (en mol. mL ⁻¹) mesuré par ICP-MS et la densité cellulaire de <i>Bacillus subtilis</i> mesurée par microscopie sur un microscope Z1-observer avec une chambre de Petroff Hausser (en cell.mL ⁻¹). La ligne noire représente la régression linéaire avec un R ² = 0.98 et les pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95%	34

FIG 14 Biofilm induction, siderophore production, and cellular Fe quotas during the growth of <i>B. subtilis</i> 3610 P _{tapA} -yfp grown at 30°C in a static MSgg medium supplemented with 10 ⁻⁴ M FeCl ₃	45
Fig 15. Effects of siderophore production and biofilm formation on bacterial growth and intracellular Fe concentration. Bacterial density (A) and intracellular Fe concentrations (B) of <i>B. subtilis</i> WT, <i>epsA-O tasA</i> , and <i>dhbA-F</i> strains. Phosphorus quantification was used as a proxy for cell quantification (Fig. 13). Results are the means from the three biological replicates, and error bars represent standard deviations. Strains were grown at 30°C in MSgg medium supplemented with 10 ⁻⁴ M FeCl ₃ . Lowercase letters indicate significant differences (P < 0.05).	47
Fig 16. Acquisition of iron from the medium by <i>B. subtilis</i> during growth. Bars show intracellular concentrations of ⁵⁷ Fe (gray) and ⁵⁶ Fe (dark gray). Cells were grown at 30°C in MSgg medium supplemented with 10 ⁻⁴ M of ⁵⁷ Fe. Results are the means from the three biological replicates, and error bars represent standard deviations.	49
Fig 17. Effect of bacillibactin addition on the growth of <i>B. subtilis</i> WT and <i>dhbA-F</i> and <i>epsA-O tasA</i> mutants.	51
Bars represent cell densities of <i>dhbA-F</i> and <i>epsA-O tasA</i> mutants in the presence (square patterns) and absence (solid patterns) of 10 ⁻⁵ M bacillibactin addition compared to that of the WT. Results are the means from three biological replicates, and error bars represent standard deviations. Strains were grown in at 30°C in MSgg medium supplemented with 10 ⁻⁴ M FeCl ₃ . Lowercase letters indicate significant differences (P < 0.05).	51
Fig 18. Complexation of Fe by the biscatechol siderophore azotochelin in the presence and absence of biofilm.	52
Fe-azotochelin complex formation was monitored by UV-Vis spectrometry 3 h after the addition of 10 ⁻⁴ M azotochelin. Complexation was assayed in MSgg medium (-), MSgg medium supplemented with 10 ⁻⁵ M DefE (-biofilm+DefE), and in the <i>dhbA-F</i> mutant cultured in MSgg medium supplemented with 10 ⁻⁵ M DefE (+biofilm+DefE)	52
Fig 19. (Figure 1). <i>B. subtilis</i> biofilm accumulates Fe (A) Fe content (in M) was measured in <i>B. subtilis</i> cells and biofilm matrix after 22h of growth at 30°C in MSgg supplemented with 10 ⁻⁴ M of FeCl ₃ . (B) Fe content of biofilms formed by wildtype (light gray bars), <i>epsA-O</i> (no exopolysaccharides, white bars) and <i>tasA</i> (no TasA fibers, dark gray bars) measured after 22h of growth at 30°C in MSgg supplemented with 10 ⁻⁴ M of FeCl ₃	61

Fig 20. (Figure 2). Procedure for Fe isotopic labeling of <i>B. subtilis</i> cells and biofilms Cells were precultured at 30°C in liquid MSgg medium containing pure ^{56}Fe (10^{-4} M) for several generations to produced ^{56}Fe labelled cells (a), then cells were inoculated in a MSgg medium containing pure ^{56}Fe and grown for 22h to produce the ^{56}Fe -labeled robust biofilm (b). Following biofilm formation, the ^{56}Fe -labeled cells and biofilm were transferred in a new MSgg medium containing no Fe (c) or pure ^{57}Fe provided as FeCl_3 or Fe-tannic acid (d). Fe content (^{56}Fe and ^{57}Fe) in cells and cells + biofilm was monitored for 6 hours. Fe content in the biofilm matrix was calculated by subtracting cellular Fe to total biofilm Fe (cells + matrix). Acquisition of new Fe was calculated by subtracting the amount of cell bound Fe (number of cells x Fe cellular quotas) 6 hours after transfer to the amount of cell bound Fe at T0 (composed of 100% ^{56}Fe)	62
Fig. 21. Influence of environmental Fe on <i>B. subtilis</i> growth and Fe acquisition strategy Panels show cellular growth (A), total intracellular Fe concentration (B), isotopic distribution of new cellular Fe (C), and isotopic composition of biofilm-bound Fe (D) of <i>B. subtilis</i> cells 3 and 6 hours after transfer in a MSgg medium containing no Fe (white bars), 10^{-4} M $^{57}\text{FeCl}_3$ (light gray bars) or 10^{-4} M ^{57}Fe -tannic acid (dark gray bars).	63
Fig 22. Complexation of Fe by the triscatechol siderophore bacillibactin in presence of FeCl_3 and Fe-tannic acid Formation of Fe-bacillibactin complex, expressed as % of Fe complexed to bacillibactin, in the presence of 10^{-5} M Fe-tannic acid (circles) and 10^{-5} M FeCl_3 (squares). Complexation was assayed in MiliQ water supplemented with 10^{-5} M of bacillibactin	65
Fig 23. Schematic framework for biofilm-bound and environmental Fe management by <i>B. subtilis</i> Bacteria secrete siderophores in the environment to recruit Fe from natural sources (oxides and organic matter) (A). Siderophore-Fe complexes can be directly taken up by cells (B) and/or contribute to refuel Fe in the biofilm (C). The biofilm contains large amount of Fe (an order of magnitude more than cells), a large fraction of which is used for extracellular metabolic function (e.g., EET) (D) and the rest can be mobilized for uptake (E). The mechanism underpinning the accumulation of Fe in the biofilm and the mobilization of Fe from the biofilm for uptake remain unclear.	67
Fig.24. Schémas illustrant les hypothèses sur les processus permettant le maintien de l'homéostasie du Fe dans une culture de <i>Bacillus subtilis</i> . Incluant l'homéostasie intracellulaire et matricielle.	70
Fig. Annexe 1. Corrélation linéaire entre le poids sec du biofilm bactérien et l'expression du rapporteur $P_{\text{tapA-yfp}}$	78

Fig. annexe 2. Croissance et variation des quotas intracellulaires en fer du double mutant <i>espA-O, tasA</i> en absence et présence de BB-Fe	79
Fig. annexe 3. Induction du Biofilm du mutant <i>dhbA-F</i> en présence ou absence de BB ou BB-Fe.....	80
Fig. annexe 5. Production de BB dans le biofilm et le surnageant de <i>B.subtilis</i> WT et du double mutant <i>epsA-O tasA</i> au cours d'une croissance.....	82
Fig. annexe 6. Croissance de <i>B.subtilis</i> WT et du double mutant <i>epsA-O, tasA</i> sous d'agitation.....	83
Fig. annexe 7. Photos d'un biofilm de <i>bacillus subtilis</i> sur surface solide	84
Fig. annexe 8. Tableau des pourcentages de recouvrement des cartouches SPE lors de l'extraction des sidérophores	84
Fig. annexe 9. Croissance et induction du biofilm de <i>B.subtilis</i> WT.....	85
Fig. annexe 10. Croissance de <i>B.subtilis</i> WT et des mutants <i>dhbA-F</i> et <i>epsA-O tas A</i> dans une culture Msgg statique à 30°C	86

INTRODUCTION GENERALE

Le fer (Fe) est un micronutriment essentiel à tous les organismes vivants. Il est incorporé comme cofacteur de nombreuses enzymes et est impliqué dans de nombreuses réactions biologiques comme la synthèse d'ADN, d'acides aminés, la production de molécules d'ATP, la fixation d'azote ou encore la photosynthèse^{1,2}. Bien qu'étant le 4^{ème} élément en abondance de la croûte terrestre³ le fer est présent majoritairement sous forme d'oxydes et d'hydroxydes de fer extrêmement peu solubles ($< 10^{-18} \text{ M}$) à pH physiologique⁴. Ces hydroxydes de fer qui précipitent sont très difficilement assimilables par les organismes, et donc malgré son abondance le fer est une ressource rare et limitante. Cette faible biodisponibilité du fer est une contrainte importante pour tous les organismes et ceci est particulièrement bien illustré et documenté lors des interactions hôte-pathogène où l'hôte va tenter de réduire l'accès à son réservoir de fer pour limiter la croissance du pathogène (immunité nutritionnelle)⁵. Cette séquestration du fer se fait par la sécrétion de molécules à très forte affinité pour le fer (protéine ferritine) et la sécrétion de protéines dans le sérum comme la transferrine (constante d'affinité pour le fer de 10^{22} M^{-1})⁶. En réponse à cela, les pathogènes ont aussi évolué de sorte à sécréter des molécules avec une plus forte affinité pour fer, ou encore pour détériorer ces protéines de séquestration. Cet exemple montre qu'au-delà d'une ressource rare et limitante, le fer est une source de compétition pour les organismes.

A ce jour, deux grands mécanismes d'acquisition du fer ont été décrits. Un premier mécanisme, peu répandu sauf chez quelques levures comme *S. cerevisiae*, utilise des protéines de surface pour réduire le fer environnemental $\text{Fe}(\text{OH})_3$ en ion Fe^{2+} et l'internaliser directement^{7,8}. Un deuxième mécanisme, beaucoup plus répandu, est quant à lui non réductase-dépendant. Ce mécanisme ne nécessite pas d'enzyme ferriréductase de surface, mais la production de petites molécules solubles avec de fortes affinités pour les ions ferriques (Fe^{3+}) : les sidérophores⁹. Ces sidérophores vont complexer les ions ferriques libres, et ainsi déplacer l'équilibre chimique du fer dans son environnement favorisant la dissolution des oxydes de fer^{10,11}. Les complexes vont ensuite être internalisés dans les cellules via des récepteurs spécifiques de haute affinité. Cependant, plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité des sidérophores comme le degré d'oxydation du fer, le pH ou si le fer est complexé ou non à de la matière organique ou à d'autres molécules sécrétées par d'autres microorganismes^{12,13}.

Une autre source organique dans l'environnement pouvant complexer les métaux (et donc le fer), est la présence de biofilm bactérien. De nombreuses études ont montré que le fer pouvait être complexé aux exopolysaccharides et polypeptides composant la matrice extracellulaire des biofilms bactériens¹⁴⁻¹⁶. De

plus, des études ont montré que les biofilms bactériens exhibent diverses propriétés physico-chimiques pouvant influencer la performance des sidérophores comme des gradients de pH ou d'oxydation ¹⁴. Ces phénomènes sont d'autant plus importants que Costerton en 1987 a montré que le biofilm est le mode de vie principal des bactéries dans la nature. Plus récemment, Flemming en 2019 a estimé que 80% des bactéries et des archéobactéries sur Terre vivaient sous forme de biofilm, exception faite des océans. REF. De plus, plusieurs études ont montré que la formation du biofilm bactérien chez divers microorganismes est influencée par la concentration et la forme du fer présent dans le milieu ¹⁷⁻²².

Cependant, malgré tous ces indices et l'ubiquité des biofilms, il existe très peu d'études sur l'importance des interactions entre le biofilm et les sidérophores sur l'acquisition et l'homéostasie du fer par les microorganismes. Ainsi, une des questions abordées dans cette étude sera de déterminer dans quelle mesure l'interaction entre le biofilm de *Bacillus subtilis* et la production de sidérophore influence l'acquisition du fer, son homéostasie et la croissance des bactéries. Les biofilms bactériens sont capables de complexer du fer, mobilisable par la bactérie, dans leurs matrices extracellulaires offrant une source locale de nutrition ¹⁶. Cependant, plusieurs questions demeurent ; dans quelle mesure cette réserve locale de fer peut soutenir la croissance bactérienne. La mobilisation de cette réserve est-elle dépendante des conditions environnementales en fer (disponibilité du Fe à l'extérieur du biofilm) ? C'est pourquoi dans un second temps nous avons étudié comment *Bacillus subtilis* gère l'acquisition du Fe depuis la réserve locale de son biofilm en fonction de la disponibilité du Fe environnemental.

Si ces questions n'ont pas été adressées jusqu'à présent dans la littérature c'est qu'il est essentiel, afin de caractériser l'homéostasie du fer, de mesurer de manière adéquate et précise les concentrations intracellulaires en Fe, ainsi que la croissance cellulaire dans des cellules se développant en biofilms. Pour cela, il est nécessaire d'isoler les bactéries de la matrice extracellulaire tout en préservant leur intégrité cellulaire. C'est pourquoi le premier objectif de cette étude fut le développement d'une méthode d'isolement des cellules d'un biofilm afin de permettre le dénombrement et l'analyse de leur contenu cellulaire en métaux.

Pour cette étude, nous avons utilisé l'organisme modèle *Bacillus subtilis* NCIB3610. Cette bactérie à Gram positif peut être manipulée génétiquement, ses sidérophores sont connus et plusieurs mutants viables nous intéressant pour cette étude étaient déjà disponibles. Entre autres, il s'agit de mutants incapables de produire du biofilm ($\Delta epsA-O \Delta tasA$), incapables de produire des sidérophores ($\Delta dhbA-F$) ou exprimant une protéine fluorescente lorsque la bactérie produit du biofilm ($P_{tapA-yfp}$). Ceci nous a permis d'étudier de manière systématique l'importance du biofilm et des sidérophores sur l'homéostasie

du Fe, en combinant des techniques de chimie analytique et de microbiologie pour suivre au cours du temps la croissance, l'évolution des quotas intracellulaires en métaux, l'expression du biofilm et de la production de sidérophores par la bactérie lorsqu'elle possède tous les composants (biofilm et sidérophores) ou que l'un d'eux est manquant. L'utilisation d'isotopes du fer (56, 57 et 54) nous a également permis de mettre en évidence la provenance (biofilm ou milieu extramatriciel) du fer que la bactérie acquière dans diverses conditions.

Le premier chapitre de cette thèse détaillera les données de la littérature afin de familiariser les lecteurs avec les théories et les connaissances nécessaires à la compréhension de cette étude. Le second chapitre présentera les méthodes biologiques et analytiques communes qui ont été utilisées pendant cette étude. Le chapitre trois présentera les méthodes développées spécifiquement pour cette étude. Enfin, les chapitres 4 et 5 présenteront les résultats obtenus sous forme d'articles insérés.

CHAPITRE 1. MISE EN CONTEXTE GENERALE

1.1.L'importance du fer pour les microorganismes

Le fer est nécessaire à toutes les formes de vie, de la bactérie jusqu'à l'Homme. Il est un cofacteur important de nombreuses enzymes qui catalysent de nombreuses réactions du vivant comme le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire, la synthèse d'ADN, la fixation d'azote ou encore la photosynthèse. L'importance centrale du fer tient autant à ses propriétés physico-chimiques, permettant le transport d'électrons et la catalyse de réactions d'oxydoréductions en oxydant les ions ferreux (Fe^{2+}) présents dans les enzymes en ions ferriques (Fe^{3+}), qu'à l'abondance de ce dernier sous sa forme d'ions ferreux dans les océans quand la vie est apparue il y a des milliards d'années. En effet, le fer est très abondant sur Terre, il est le 4^{ème} élément le plus abondant de la croûte terrestre³ et il était sous forme d'ions ferreux (Fe^{2+}) durant les premières centaines de millions d'années du développement de la vie sur notre planète. C'est sous cette forme qu'il a été incorporé au cours de l'évolution comme élément central des enzymes. Cependant, avec l'apparition de la photosynthèse, il y a environ 3,8 milliards d'années, de l'oxygène a été formé et relâché. Les océans réducteurs sont devenus progressivement des océans oxydants et lors de cette transition l'oxygène a oxydé les ions ferreux (Fe^{2+}) en ions ferriques (Fe^{3+}). Ces derniers formant des hydroxydes $\text{Fe}(\text{OH})_3$ qui sont extrêmement peu solubles ($< 10^{-18} \text{ M}$) à pH physiologique⁴. Durant cette transition, la biodisponibilité du fer a fortement diminué.

Dans les sols, le fer peut se retrouver sous forme d'oxyde de fer ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) ou complexé à de la matière organique comme les acides humiques ou les tannins, ce qui réduit drastiquement sa biodisponibilité le rendant très difficilement mobilisable et assimilable. Ce faisant, le fer est une ressource rare, limitante, mais toujours indispensable au bon fonctionnement des processus biologiques. Cette transition d'une biosphère réductrice vers une biosphère oxydante a forcé les microorganismes à développer des stratégies d'acquisition du fer oxydé, la plus développée étant la sécrétion de molécules de haute affinité pour le Fe: les sidérophores.

1.2. Les sidérophores

1.2.1. Généralités

Pour acquérir de façon efficace le fer, les bactéries ont développé différentes stratégies de capture du métal. Les bactéries comme *Bacillus subtilis* possèdent un régulateur de l'acquisition du fer ou Ferric uptake regulator (Fur) qui utilise le Fe^{2+} comme cofacteur pour réprimer les stratégies d'acquisition du Fe de la bactérie. Chez *Bacillus subtilis* Fur- Fe^{2+} réprime en tout 20 opérons (environ 40 gènes) dont la majorité code pour des transporteurs de type ABC^{23,24} et pour la synthèse de sidérophores.

Lors d'une carence en fer dans la bactérie, la protéine Fur va perdre son fer et sera incapable sous sa forme apo de se fixer sur les sites de liaison de Fur (FBS), ce qui va permettre la transcription de l'opéron encodant la machinerie non-ribosomale de synthèse du sidérophore²⁵ (Fig 1).

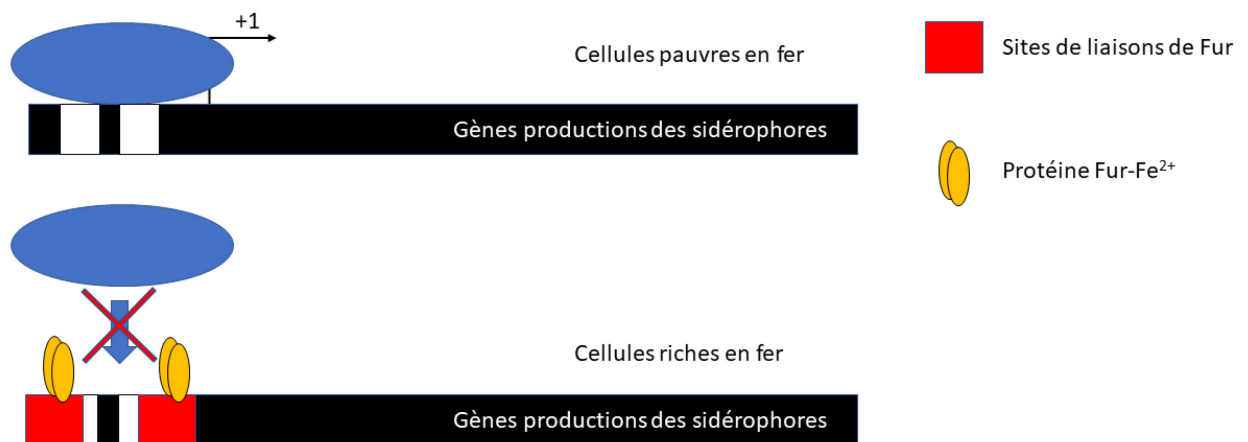


Fig.1. Schémas du modèle classique de répression par Fur des gènes impliqués dans la synthèse de sidérophores. Inspiré et modifié de Troxell et Hassan 2013

Dans le cadre d'une carence intracellulaire en fer, la bactérie va alors synthétiser et excréter ses sidérophores dans son milieu. Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire (200 à 2 000 Da) capables de chélater avec une très haute affinité le fer ferrique Fe^{3+} ^{12,26}. Les sidérophores sont exportés dans le milieu extérieur par des protéines transmembranaires, mais seulement quelques exportateurs de sidérophores ont à ce jour été étudiés et caractérisés, la plupart chez des bactéries à Gram négatif. Ces protéines sont définies comme des protéines transmembranaires membres de la superfamille des facilitateurs (ou FMS), qui facilitent la diffusion de petites molécules dissoutes par gradient de concentration. Ces exportateurs de sidérophores sont aussi régulés par FUR. Bien que très peu sont connus chez les bactéries à Gram positif, en 2008 Miethkhe et al. ont identifié YmfE comme le FMS responsable de l'excrétion des sidérophores chez *Bacillus subtilis* ²⁷.

Dans le milieu extracellulaire, les sidérophores vont complexer le fer (Fe^{3+}). Les complexes sidérophore- Fe^{3+} sont ensuite internalisés par les microorganismes via des récepteurs à haute affinité. Cependant, dans certains cas, le fer est directement réduit à la membrane et le complexe n'est donc pas internalisé ^{28,29}. Ces transporteurs de sidérophores sont très diversifiés et diffèrent entre les bactéries à Gram positifs et celles à Gram négatifs. Chez les bactéries à Gram négatifs, ces récepteurs sont situés sur la membrane externe (OMR) et dépendent du complexe TonB, un complexe protéique de transduction d'énergie. Ces récepteurs externes reconnaissent et transportent des complexes Fe-sidérophores dans le périplasme avant d'être pris en charge par un transporteur ABC qui le véhicule dans le cytoplasme. Chez les bactéries à Gram positifs, l'acquisition et l'importation des sidérophores sont faites par des transporteurs ABC ³⁰. Il existe de nombreux transporteurs de types ABC qui reconnaissent et transportent un sidérophore ou une famille de sidérophores bien spécifique.

Une fois internalisé, la libération du fer du complexe fer-sidérophore se fait généralement via la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} , ce qui entraîne la libération de l'atome de fer, car les sidérophores ont une très faible affinité pour le Fe^{2+} . Un autre mécanisme possible est la dégradation du sidérophore via une enzyme spécifique, *e.g.* la bacillibactine, un sidérophore majeur de *Bacillus subtilis*, est clivé par la bacillibactin esterase BesA ³¹.

A ce jour, plus de 500 sidérophores ont été identifiés et sont classifiés selon leurs structures chimiques en 6 grandes familles (fig 2) :

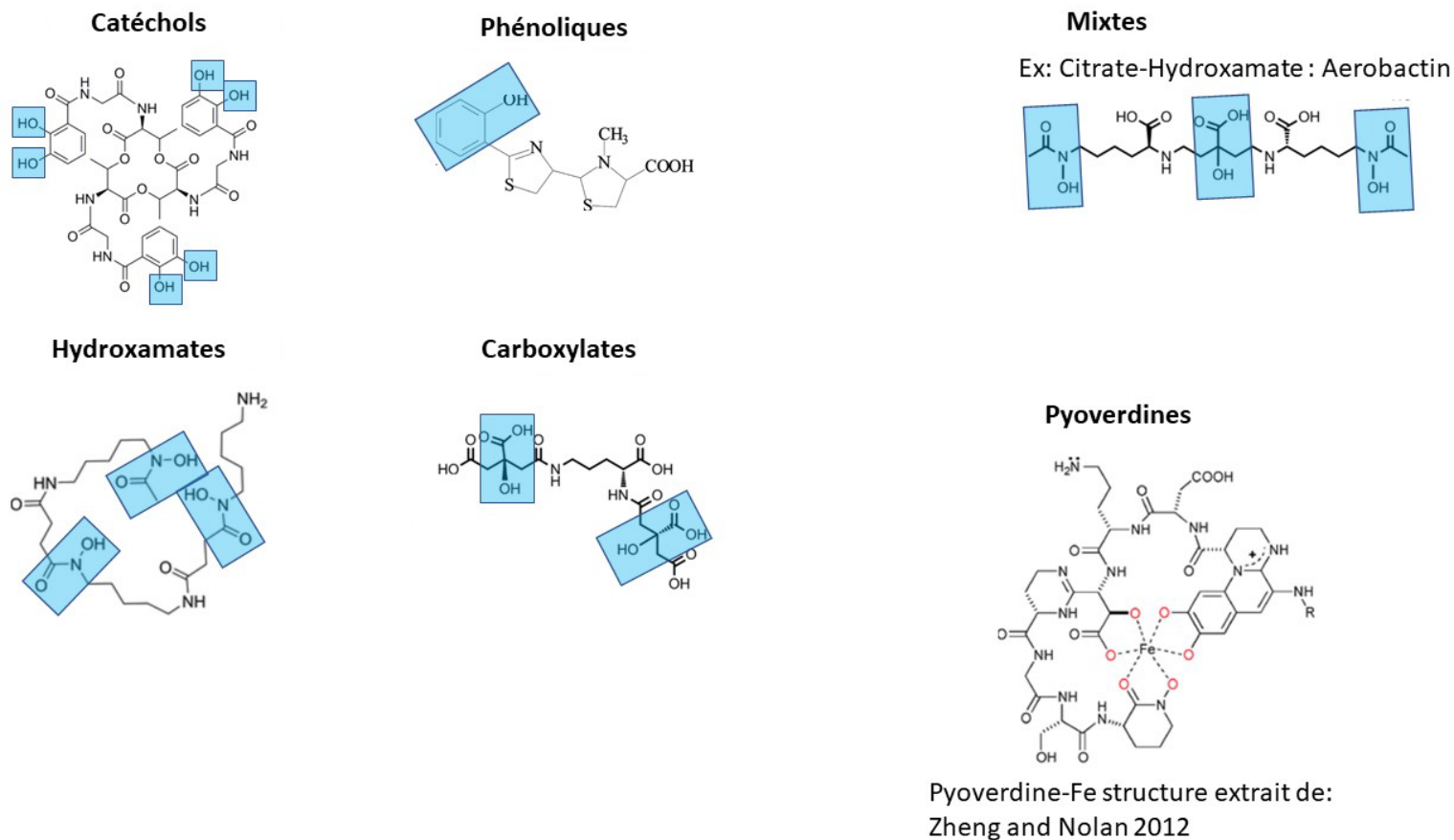


Fig.2. Six grandes familles de sidérophores. Les cadres bleus sont les fonctions responsables de la complexation du fer.

Toutes les bactéries ne sont pas capables de synthétiser tous les sidérophores, en revanche de nombreuses bactéries sont capables d'internaliser certains complexes sidérophores- Fe^{3+} qu'elles sont incapables de synthétiser elles-mêmes. On parle alors de stratégie de piratage des sidérophores exogènes. Pour se faire, ces bactéries expriment plusieurs types de récepteurs transmembranaires de types ABC décrits précédemment.

1.2.2. Les sidérophores de *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis est capable de synthétiser deux sidérophores, soit l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque (DHBA) et la bacillibactine (BB). La bacillibactine a été d'abord découverte chez *Corynebacterium*

glutamicum, c'est pourquoi elle est nommée dans de nombreuses études antérieures corynebactine. L'existence d'un troisième sidérophore a fait débat, le DHBG ou l'acide itoïque. Le DHBG est un conjugué de la DHBA avec un résidu glycine découverte en 1958 par Ito³². Considéré d'abord comme un sidérophore, car sa synthèse était corrélée à un déficit en fer, il a été démontré plus récemment que sa capacité à complexer le fer est bien trop faible pour être important dans un contexte naturel³³. De plus DHBG s'est avéré être un précurseur de la synthèse de la bacillibactine. Le gène *dhbA* est responsable de la synthèse du 2,3-dihydroxy benzoïque acide (DHBA) à partir du chorismate (Fig. 4). *DbhC* est un isochorismate synthétase. Le groupe *DhbE-B-F* est un complexe permettant la synthèse de la bacillibactine via un mécanisme non ribosomique décrit en 2001 par May.^{34,35} La Bacillibactine ainsi formée (Fig 3) est un sidérophore triple catéchol de très haute affinité pour le fer, Fe^{3+} avec une constante $K_f = 10^{45} \text{ M}^{-1}$.³⁶

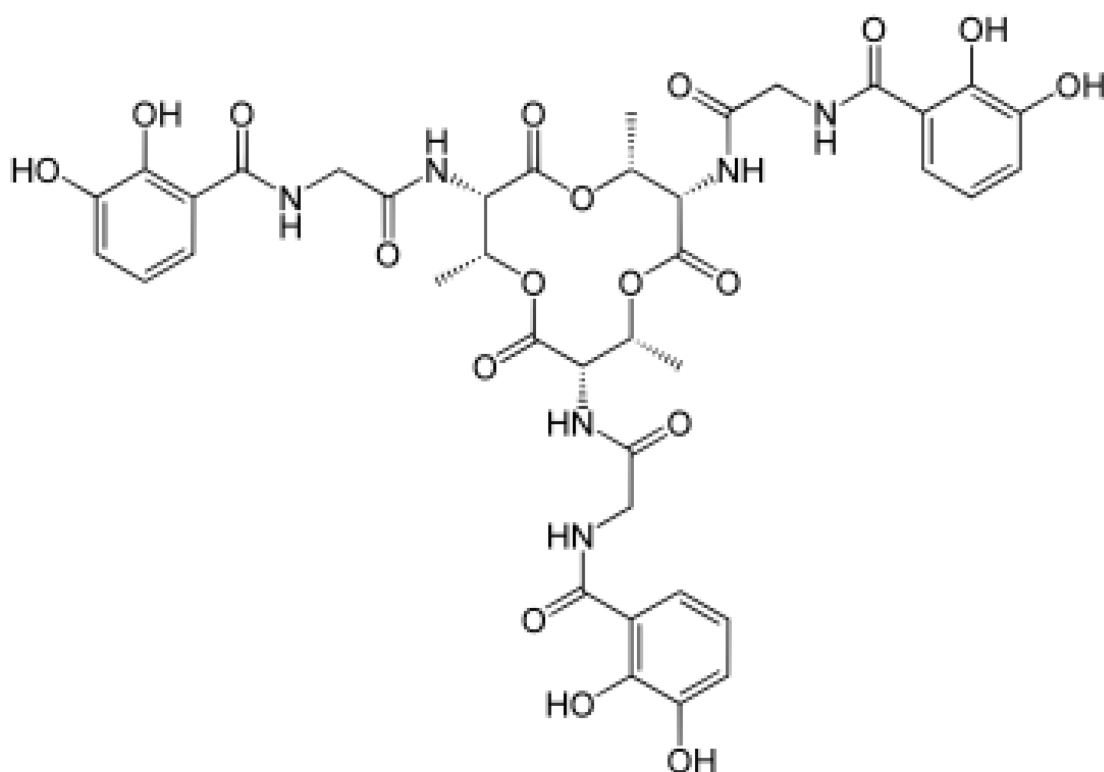


Fig.3. Structure de la bacillibactine produite par *Bacillus subtilis*.

La délétion de l'opéron *dhbA-F* (Fig 4) permet ainsi d'obtenir un mutant de *Bacillus subtilis* ne produisant aucun sidérophore.



Fig.4. Opéron encodant les enzymes de la synthèse de la bacillibactine et DHBA chez *Bacillus subtilis*

Bien que *Bacillus subtilis* ne puisse produire que deux sidérophores, il est capable d'exprimer 4 types de transporteurs ABC lui permettant de pirater et d'internaliser des xénosidérophores de son environnement. (Fig 5)

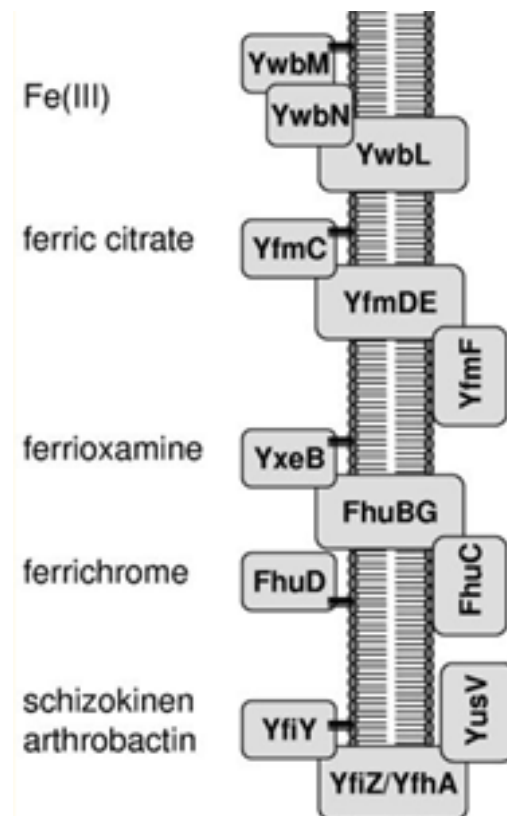


Fig.5. Les 4 transporteurs de type ABC du fer chez *Bacillus subtilis*. Extrait de (Ollinger et al) 2006 ³⁷

1.3. Les biofilms

1.3.1. Généralité sur les biofilms

Les bactéries sont des organismes unicellulaires capables de communiquer par des signaux chimiques et vivant majoritairement en communautés multicellulaires enfermées dans une matrice d'exopolysaccharides et de polypeptides autosécrétés. Ces structures sont appelées biofilms. Les biofilms bactériens, composés d'une ou de plusieurs espèces bactériennes, sont ubiquitaires. On les retrouve sur les plantes, *e.g.* biofilm bactérien sur les feuilles et les racines des arbres et des herbacés (Fig 6).

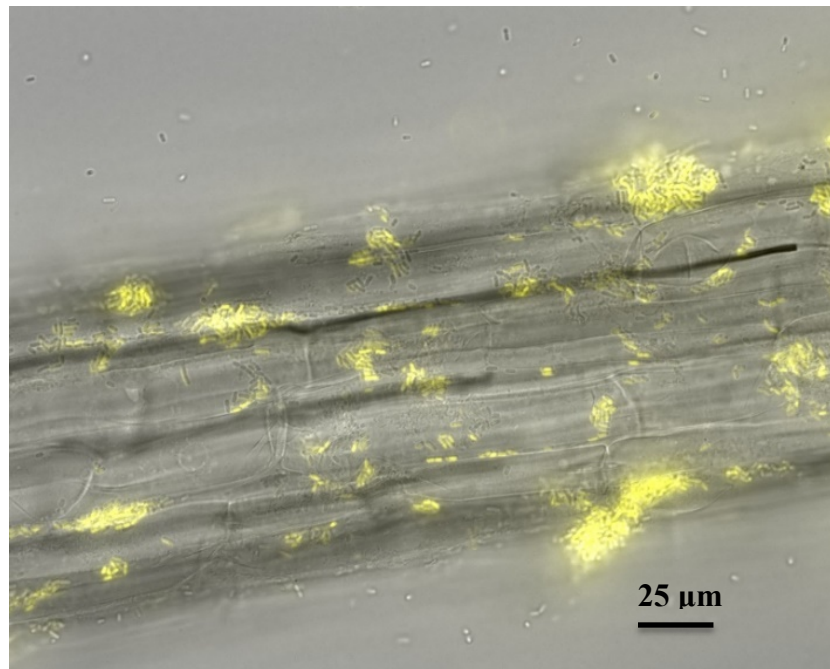


Fig.6. Colonisation d'une racine d'*Arabidopsis thaliana* par *Bacillus subtilis* 3610 P_{tapA} -yfp exprimant une protéine fluorescente quand sous forme de biofilm observé par microscope à fluorescence (Rizzi Adrien 2016, non publiée).

On les retrouve également dans ou sur d'autres organismes vivants comme l'Homme, *e.g.* biofilm polybactérien sur les dents³⁸ ou encore dans les sols.

1.3.2. Le biofilm de *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis est capable de former des biofilms avec des interfaces solides, mais aussi à l'interface air-liquide ³⁹. La formation de biofilm chez *Bacillus subtilis* est un phénomène étudié depuis plusieurs décennies et sa régulation est bien décrite (fig 7). Tout commence par l'activation d'un régulateur Spo0A via sa phosphorylation par quatre différentes kinases (KinA, KinB, KinC et KinD). Depuis les travaux de Grau en 2015, on sait que KinC et KinD sont les deux principales kinases impliquées dans la régulation de la formation du biofilm ⁴⁰. Plusieurs études ont permis d'identifier de très nombreux signaux pouvant activer ces kinases comme la nystatine qui cause une fuite d'ion potassium, une augmentation de la concentration en ion manganèse ou encore la présence de pectine ou de xylane ⁴¹⁻⁴⁴. Récemment, en 2013, Kolodkin-Gal et al. ont montré que les deux autres kinases B et A sont activées lorsque la chaîne respiratoire de *Bacillus subtilis* est altérée entraînant un déséquilibre du rapport NADH/NAD⁺ ¹⁸.

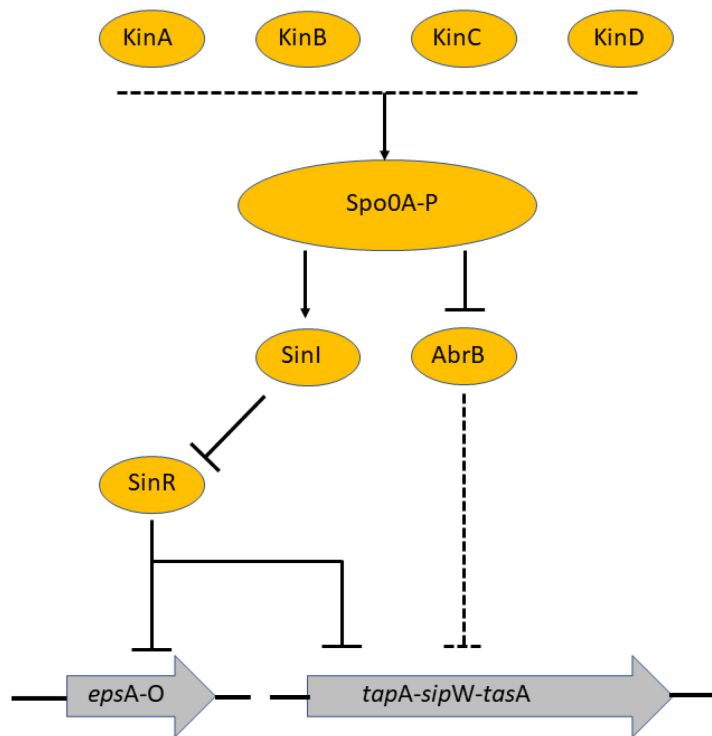


Fig.7. Voie d'activation des opérons *epsA-O* et *tapA-sipW-tasA*

1.3.3 Les composants majeurs du biofilm de *Bacillus subtilis*

Chez *Bacillus subtilis*, les gènes exprimant la matrice extracellulaire sont présents dans deux opérons majeurs, *epsA-O* et *tapA-sipW-tasA*. L'opéron *epsA-O* contient 15 gènes et est responsable de la formation et de la sécrétion d'exopolysaccharides constituant la matrice extracellulaire. L'opéron *tapA-sipW-tasA* en revanche code pour un ensemble de protéines structurales de la matrice extracellulaire. *tasA*, par exemple, est responsable de la formation de fibres amyloïdes qui est un des constitutifs protéiques principaux de la matrice extracellulaire^{45,46}. Il est extrêmement difficile de connaître la nature exacte des composants et de l'architecture tridimensionnelle d'un biofilm, car la concentration en peptides ou en sucres et leur composition vont varier en fonction des concentrations et de la nature des nutriments disponibles dans le milieu de culture⁴⁷. On peut néanmoins citer certains de ces composants comme les poly-N-acetylglucosamine⁴⁸ dont la production est contrôlée par les gènes *epsHIJK* ou les LEVAN de type I et II (des polymères de β -2,6 D-Fructose)^{47,49}, les fibres amyloïdes, ou encore 7 classes d'exoprotéases décrites en 1993 par Pero et Sloma⁵⁰. De façon globale, les exopolysaccharides et les polypeptides sont considérés, dans un biofilm, comme des biens partagés permettant aux bactéries ne pouvant synthétiser l'un d'entre eux d'en profiter. La délétion d'un de ces deux opérons conduit à la formation de biofilm incomplet. Cependant, une mise en culture ensemble de ces deux mutants conduira à la formation d'un biofilm complet comme celui de la souche sauvage, puisque la production des deux composantes de la matrice se complèteront de façon extracellulaire⁴⁶. La délétion des deux opérons conduit à la perte de la capacité à former un biofilm. Ce double mutant de délétion *epsA-O tasA* sera employé au cours de notre étude comme bactérie capable de sécréter des sidérophores, mais incapable de former le moindre biofilm afin d'étudier l'impact de ce dernier sur la performance des sidérophores et l'acquisition du fer.

1.3.4. Complexation des métaux

En dépit de la grande variabilité des constituants de la matrice extracellulaire, qui est souche et milieu dépendant, plusieurs études ont néanmoins étudié plus en détail les propriétés de certains de ses constituants une fois isolés et purifiés. Ainsi, plusieurs études ont montré que des composants du biofilm bactérien sont capables de complexer des métaux^{15,16,51}.

En 2010, Papageorgiou et al. ont montré que les alginates (des polysaccharides entrant dans la composition de la matrice extracellulaire de nombreuses bactéries à Gram négatif) étaient capables, grâce à leur conformation, de complexer des métaux . En effet, l'enchaînement des résidus mannuronique et guluronic conduit à l'apparition de structures dites en boîte d'œuf ou les métaux peuvent être complexés. Les alginates ainsi étudiés ont montré la capacité de complexer dans ces structures divers métaux comme le fer, mais aussi le Cd, le Cu, le Pb ou encore le Mn.

Néanmoins, toutes ces études sur des composés isolés et purs possèdent un biais important. En effet, lors de ces études, on ne prend pas en compte la structure tridimensionnelle de la matrice du biofilm bien plus complexe, car ces composés sont associés en réseau avec d'autres composants sécrétés par les mêmes bactéries ou dans le cas de biofilm naturel multi espèce par d'autres bactéries. De plus, ces études ne prennent pas en compte l'existence de gradients (ex. pH ou redox) qui règnent à l'intérieur d'un biofilm et qui peuvent changer les charges apparentes de ces molécules et donc leurs propriétés.

D'autres études, comme celle de Dynes (2006), ont choisi une approche basée sur l'observation par la microscopie à transmission à rayon X de biofilms isolés d'environnements naturels afin d'étudier la présence de métaux et leur distribution spatiale dans la matrice de biofilm. (Fig. 8)

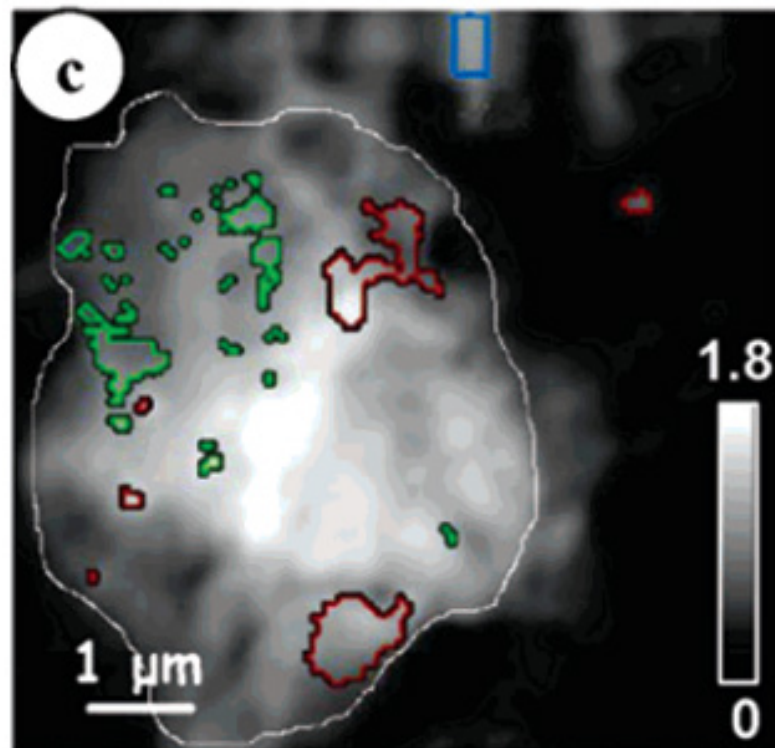


Fig.8. Distribution spatiale du Fe²⁺ (vert) et Fe³⁺ (rouge) dans un biofilm isolé de rivière. Résultats extraits de Dynes et al ⁵¹.

L'étude de Dynes ⁵¹, au-delà de démontrer la présence de fer complexé dans un biofilm naturel et sa distribution non uniforme, montre également la coexistence de la forme réduite et de la forme oxydée du fer dans un biofilm naturel. Et donc de l'existence de régions plus réductrices que d'autres en adéquation avec les observations précédentes de gradient de potentiel dans un biofilm.

Autant de paramètres qui peuvent influencer la capacité de la bactérie à acquérir ce dernier par le biais de ses sidérophores.

Le rôle biologique exacte de ces métaux reste encore peu connu, mais de récentes études ont montrés que dans le cas de *Bacillus subtilis* du fer complexé à la matrice extracellulaire pouvait servir à soutenir des processus biologiques de respiration en servant d'accepteurs terminaux d'électrons en étant réduit en fer.

1.4. La notion d'homéostasie métallique

L'homéostasie est par définition la capacité d'un organisme à maintenir un paramètre interne (température, pression ou concentration) dans des conditions optimales et ce peu importe les variations des conditions extérieures. Pour les métaux (ou les micronutriments), cela correspond à la capacité de l'organisme à maintenir ses quotas intracellulaires à une concentration suffisante, mais non toxique, pour soutenir une croissance optimale (Fig 9).

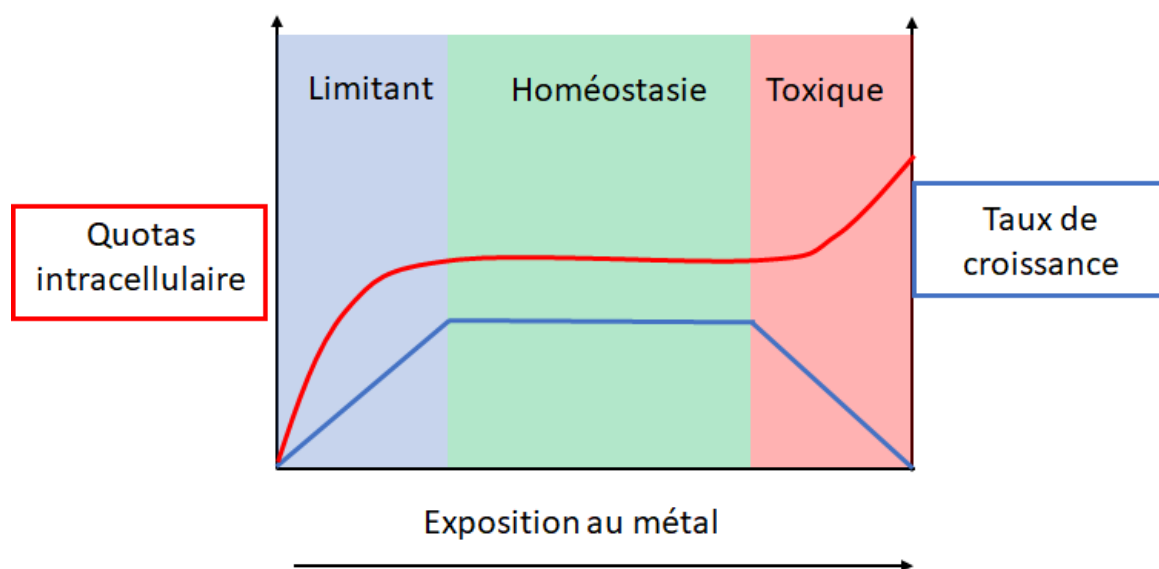
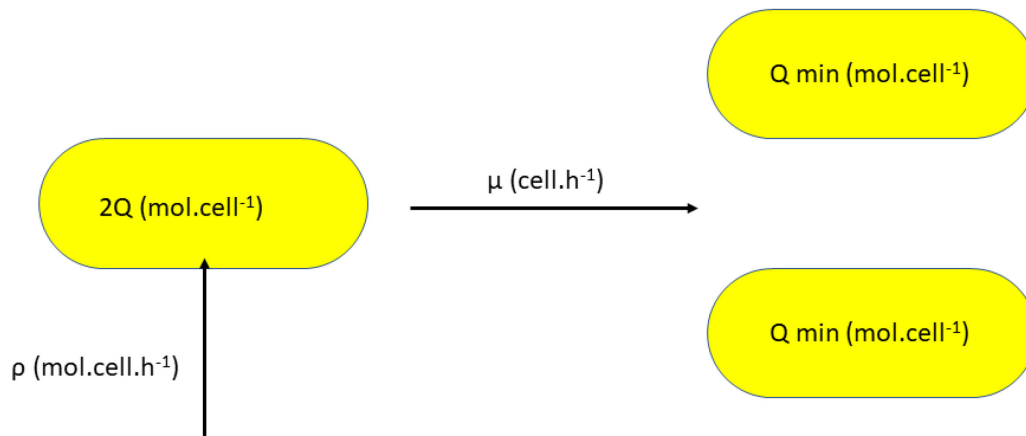


Fig.9. Schémas illustrant le principe de l'homéostasie

Un des premiers modèles d'homéostasie pour les nutriments a été décrit par Droop en 1973 sur des algues⁵². De façon générale, 3 paramètres majeurs influencent l'homéostasie métallique (Fig 10).



μ = la vitesse de croissance (le temps entre chaque doublement va dépendre du temps qu'il faut à la cellule pour doubler son contenu intracellulaire par rapport à son minimum requis pour vivre)

ρ = Vitesse de transport nette (entrée – sortie)

Q_{min} = Quota intracellulaire minimum requis pour maintenir les fonctions physiologiques

Fig.10. Schémas illustrant les 3 paramètres majeurs influençant l'homéostasie

Par une équation aux dimensions, on remarque que ces 3 paramètres sont interconnectés tel que :

$$\rho = \mu * Q \quad (1)$$

Il est à noter qu'aucun mécanisme d'excrétion du fer n'a été décrit à ce jour. La gestion de l'homéostasie du fer se fait donc uniquement sur une modulation de son acquisition de façon à maintenir des conditions internes optimales, et ce indépendamment des variations du milieu extérieur (fig. 11).

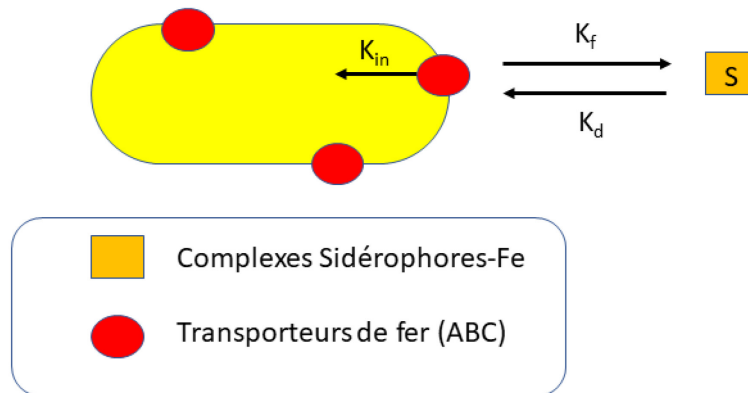


Fig.11. Schémas illustrant la cinétique d'internalisation du fer. K_{in} est la constante d'internalisation du fer, K_f la constante de formation du complexe sidérophore-fer, et K_d la constante de dissociation du complexe sidérophore-fer.

En développant les équations du modèle de la fig.11. on arrive à une équation de type Michaëlis-Menten pour exprimer la vitesse d'internalisation du fer.

$$V = (V_{\max} * S) / (K_s + S) \text{ avec } K_s = (K_d + K_{in}) / (K_f)$$

De ce fait, une bactérie pour moduler son entrée en fer peut jouer sur deux facteurs :

- A- Réguler le nombre de transporteurs du fer
- B- Modifier le K_s notamment en passant par des récepteurs spécifiques à des petites molécules, les sidérophores

1.5. Questions de recherche :

L'étude des sidérophores, notamment des constantes de complexation ou de la quantification de leur production, se fait avec des molécules pures et sous agitation.

Ce type de culture ne permet pas d'être représentatif de ce qui se passe réellement dans la nature, car cela empêche la formation des biofilms bactériens. Ces derniers, en plus d'être le mode de vie privilégié des bactéries dans la nature, exhibent une large variété de propriétés physico-chimiques pouvant influencer l'efficacité des sidérophores comme la complexation de métaux, la génération de gradient de pH ou redox.

A l'aide de *Bacillus subtilis* et de ses mutants $\Delta dhbA$ -F (ne produisant aucun sidérophore) ou $\Delta epsA$ -O *tasA* (ne produisant aucun biofilm), nous avons étudié dans un premier temps le rôle potentiel d'une interaction sidérophore-biofilm sur l'homéostasie du fer chez *Bacillus subtilis*. Notre hypothèse était que la présence du biofilm facilite l'acquisition des complexes Fe-sidérophore et participe ainsi l'homéostasie du Fe.

Un certain nombre d'études ont montré que la matrice extracellulaire de *Bacillus subtilis* pouvait immobiliser des métaux et notamment du fer. Cependant, le devenir de ce fer reste peu ou pas étudié.

Nous avons, dans un second temps, étudié le devenir du Fe associé au biofilm en fonction de la disponibilité du Fe extramatriciel. Nos hypothèses étaient que (i) ce fer intramatriciel peut être remobilisé, (ii) il constitue une source de fer pour la bactérie et (iii) que l'acquisition du Fe lié au biofilm est modulée par la disponibilité de Fe à l'extérieur de la matrice.

A l'aide de techniques microbiologiques, de biologie moléculaire et de chimie analytique, cette étude a cherché à répondre à ces différentes questions pour mieux appréhender l'impact du biofilm bactérien sur l'acquisition et la gestion du fer par les microorganismes.

CHAPITRE 2. MATERIELS ET METHODES

Le chapitre II décrit les méthodes analytiques, chimiques ou biologiques, spécifiquement employées durant l'ensemble du projet de recherche.

2.1. Notes préliminaires

Tout au long de cette section, l'eau milliQ (*e.g.* MQ) a été obtenue par double traitement de l'eau de ville de Sherbrooke. Le premier traitement est un traitement par osmose inversée effectuée par l'Université de Sherbrooke. L'eau est ensuite retraitée au sein du laboratoire en passant à travers un système Thermo Fisher Barnstead Epure (FisherScientific, Canada) permettant d'obtenir une eau avec une conductivité de 18.2 MΩ.cm. Tout au long de cette étude, les verreries ont été lavées à l'acide HCl 10% pendant 24 h afin de solubiliser les métaux pouvant être adsorbés à la surface du verre. Après ces 24 h, la verrerie a été rincée 3 fois à l'eau MQ

2.2. Bactérie modèle et milieu de culture

2.2.1. Choix de *Bacillus subtilis*

La bactérie utilisée tout au long de ce projet de recherche est *Bacillus subtilis*. *Bacillus subtilis* est une bactérie reconnue comme sécuritaire par la FDA (GRAS) et qui est un organisme modèle des bactéries à Gram positifs. Le génome de *Bacillus subtilis* a été entièrement séquencé par Kunst en 1997 et corrigé par Zeigler en 2008. Le choix d'utiliser ce microorganisme a été motivé par le fait que *B. subtilis* forme un robuste biofilm lors de cultures en milieu solide ou liquide, que ses sidérophores sont connus et que de nombreux mutants sont disponibles (Tableau 1).

Noms	Sources/références	Génotypes	Phénotypes
NCIB 3610	(Stock Laboratoire)	Souche sauvage	Souche sauvage
NCIB 3610 <i>dhbA</i> -F	(Rizzi et al., 2019)	<i>dhbA-F::erm</i>	Pas de sidérophores, mais capable de produire un biofilm
NCIB 3610 <i>epsA</i> -O	(Branda et al., 2006)	<i>epsA-O::tet</i>	Demi biofilm sans composante polysaccharidique
NCIB 3610 <i>tasA</i>	(Vlamakis et al., 2008)	<i>tasA::kan</i>	Demi biofilm sans composante protéique
NCIB 3610 <i>epsA</i> -O, <i>tasA</i>	Stock Laboratoire	<i>epsA-O::tet</i> , <i>tasA::erm</i>	Aucun biofilm, mais produit des sidérophores
NCIB 3610 P _{tapA} -yfp	(Vlamakis et al., 2008)	<i>amyE::P_{tapA}-yfp</i> (spec)	Souche sauvage qui va produire une protéine fluorescente (YFP) lors de la production de biofilm

Tableau 1 : Description des souches de *B. subtilis* employées lors de ce projet

2.2.2. Milieux de culture

Le milieu Msgg (Tableau 2) a été préparé sans aucun fer et celui-ci a été ajouté au milieu avant l'expérience lorsque nécessaire à partir de solution de fer préparée et stérilisée par filtration sur filtre 0.2 μm dans l'heure précédant l'expérience.

Noms	Fournisseurs	Concentration Finale
Phosphate Buffer		5 mM
MOPS		0.1 M, pH =7
MgCl ₂		2mM
MnCl ₂		0.05 mM
ZnCl ₂		0.001mM
CaCl ₂		0.7mM
Thiamine		0.002mM
Glycérol		0.5%
Glutamate		0.5%

Tableau 2 : Composition du milieu minimal MSgg sans fer

2.2.3 Microscopie à fluorescence :

Toutes les images microscopiques de cette étude et les décomptes cellulaires ont été faits sur un microscope inversé à fluorescence Zeiss Z1-Observer. Les images non fluorescentes ont été prises sur ce même appareil en contraste interférentiel différentiel (CID), principe décrit par Nomarski en 1952

2.3. Quantification de la production de biofilm par cytométrie de flux:

L'étude de l'expression du rapporteur $P_{tapA-yfp}$, qui permet aux bactéries d'exprimer une protéine fluorescente YFP lorsqu'elles expriment les gènes pour la formation du biofilm, a été effectuée par cytométrie de flux sur un instrument BD FACS JAZZ, de BD Biosciences, utilisant un laser de longueur d'onde de 488 nm. Les échantillons cellulaires ont été dilués dans un tampon salin (PBS) afin d'obtenir 300 à 800 événements par seconde avant enregistrement des populations bactériennes jusqu'à l'obtention de 20 000 événements. Au préalable, l'instrument a été calibré en utilisant un standard, SPHERO Ultra Rainbow Fluorescent Particles (URFP-30-2) dans 500 μ l de PBS.

2.4. Analyses élémentaires :

La quantification du contenu en métaux des cellules bactériennes ou des biofilms entiers a été réalisée en deux étapes distinctes : La première étape consiste en la séparation des cellules bactériennes de la matrice du biofilm par une technique expliquée en détail au chapitre 3. La minéralisation des échantillons est ensuite effectuée par un processus de digestion oxydative. La seconde étape consiste en une analyse par spectrométrie de masse à torche de plasma, abrégé ICP-MS.

2.4.1. La digestion oxydative des échantillons :

Les matrices biologiques, cellules et/ou biofilms, ont été reprises dans de l'acide nitrique (HNO_3), de grade métal trace, avec ou sans peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les échantillons ont ensuite été transférés dans des tubes en polypropylène dont le volume est certifié, DigiTUBE (15 mL \pm 0.1 mL, SCP Science). Ensuite, les tubes ont été placés sur un appareil SCP DigiPrep Jr (SCP science, Montréal) et les échantillons ont alors été soumis à un gradient de température afin d'assister la digestion. La rampe de température permet une élévation de la température jusqu'à 65°C en 15 minutes, puis elle est maintenue durant 1h15. Afin de s'assurer de la propreté des tubes employés lors de la digestion et de se prémunir de toute contamination, 3 blancs de digestion ont été effectués pour chaque expérience de digestion.

2.4.2. Quantification par ICP-MS

L'ICP-MS a été employée dans cette étude afin de déterminer la concentration massique de certains éléments (Rh, Mn, Mg, Fe, Cr et P), car celle-ci permet de quantifier de très faibles quantités (de l'ordre de la dizaine de ppt) et sur une grande quantité d'échantillons (quelques minutes d'analyses par échantillon). L'appareil employé lors de cette étude est un Thermo Fisher XSérie II avec un échantillonneur automatique CETAC ASX-520. L'échantillon passe par un nébuliseur équipé d'un refroidisseur thermoélectrique permettant un maintien stable de la température, donc de limiter les interférences. La partie spectroscopie de masse a été séparée du plasma d'argon par deux cônes et un hexapôle servant de cellules à collision. La partie MS est constituée d'un quadripôle permettant la sélection et l'analyse d'une seule m/z à la fois dont les paramètres pour chaque élément sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Isotopes	Solution étalon	Temps de balayage (ms)	Résolution
²⁶ Mg	M	10	Standard
³¹ P	P	10	Standard
⁵² Cr	M	10	Standard
⁵⁴ Cr	M	10	Standard
⁵⁴ Fe	M et P	30	Standard
⁵⁵ Mn	M	5	Haute
⁵⁶ Fe	M et P	5	Haute
⁵⁷ Fe	M et P	30	Standard
¹⁰³ Rh	M et P	10	Standard

Tableau 3 : Caractéristiques des méthodes analytiques élémentaires employées

Les courbes d'étalonnages ont été séparées en deux séries dont les valeurs sont données dans les tableaux (4) et (5). La série M ou mixte métaux a été préparé à partir d'une solution certifiée de 28 éléments (ESI Elemental Scientific). La série P a été préparée à partir de solutions certifiées de fer (100 ppm) et de phosphore (1000 ppm).

Nom des échantillons étalons	Concentration des éléments (ppb)
M0.001	0.001
M0.002	0.002
M0.005	0.005
M0.01	0.01
M0.02	0.02
M0.05	0.05
M1	1
M2	2
M5	5
M10	10

Tableau 4 : Descriptions de la courbe d'étalonnage mixte métaux

Nom de l'échantillon étalon	Concentration P (ppb)	Concentration Fe (ppb)
P5	5	0.5
P20	20	2
P50	50	5
P200	200	20
P500	500	50
P2000	2000	200
P5000	5000	500

Tableau 5 : Descriptions de la courbe d'étalonnage phosphore/fer

Afin de valider notre étalonnage, des standards certifiés sont ensuite analysés. Deux standards sont employés : le MRC SLRS-5 (remplacé ensuite par le SLRS- 6 dû à une rupture de production) qui est un échantillon d'eau prélevé en profondeur d'une rivière et dont la concentration en 16 éléments est certifiée par le Conseil de recherche national du Canada, et le SRM *pine needle* 1575a, qui correspond à des aiguilles de pin certifiées par le NIST (National Institute of Standards and Technology, US) qui donne la concentration de 25 éléments dont le P qui était non certifié dans le MRC-SLRS-5.

2.5. Analyses des sidérophores :

2.5.1. Traitement de la verrerie :

La verrerie peut adsorber à sa surface des composés et entraîner par la suite des biais analytiques. Ainsi, toute la verrerie utilisée dans cette partie a été préalablement désactivée par emploi de diméthylchlorosilane ($\text{SiCl}_2(\text{CH}_3)_2$). Pour se faire, la verrerie est mise au contact d'une solution de 5% de ($\text{SiCl}_2(\text{CH}_3)_2$) dans du toluène pendant 1 à 2 heures. La verrerie est ensuite lavée successivement à deux reprises au toluène de grade analytique, 3 fois au méthanol de grade analytique et 5 fois à l'eau de grade analytique.

2.5.2. Extraction des sidérophores :

Lors d'une culture de *Bacillus subtilis* dans du MSgg, des échantillons ont été collectés à intervalles réguliers et la biomasse a été séparée du surnageant par centrifugation (6500g, 20°C, 7min) dans une centrifugeuse Beckman Coulter TM de modèle J-25I équipée d'un rotor JLA 16,250. Les surnageants ont été acidifiés jusqu'à pH = 4, recentrifugés (6500g, 20°C, 7min) une nouvelle fois puis purifiés par une extraction sur surface solide à l'aide d'une cartouche Oasis HLB (waters). Les cartouches OASIS HLB (waters), lors de leur utilisation, ont été préconditionnées et équilibrées, avant le dépôt de l'échantillon à purifier, par l'élution de 2 mL de méthanol de grade analytique, puis de 2 mL d'eau de grade analytique. Cette élution a été faite par gravité à une vitesse approximative de 1 goutte par seconde. Après le dépôt et le passage de l'échantillon, la cartouche a ensuite été rincée avec 2 mL d'eau de grade analytique, puis les sidérophores ont été élués par deux fois dans 1 mL de méthanol de grade analytique.

La biomasse, quant à elle, a été séchée puis reprise avec 30 mg de NaCl dans 1 mL d'un mélange méthanol/acétonitrile (1 :1 v/v) avec 0.2% d'acide formique. Cette solution a été ensuite placée dans un bain à ultrason pendant 5 min puis agitée sous vortex. Cette étape a été reproduite 3 fois à l'identique. La solution a été ensuite centrifugée à 4600 rpm, 4°C pendant 15 min et le surnageant a été récupéré puis filtré en utilisant un filtre 0.22 µm en PTFE.

2.5.3. Quantification par UPLC-MS/MS

La quantification des sidérophores a été réalisée comme décrit par Miethke et al 2006 ⁵³. Brièvement, l'analyse de la bacillibactine (BB) et de la DHBA a été effectuée sur un appareil UPLC Xevo TQ (Waters Corporation, Milford, MA) muni d'une colonne UPLC HSS-T3 (100mm x 2.1 mm, 1.8µm) et d'un préfiltre de 0.2 mm. Le débit d'élution a été fixé à 0.4 mL par minute et la température du four de la colonne a été maintenue à 40°C. Enfin, le volume d'injection a été de 5µL. Les phases mobiles étaient composées sur la voie A d'eau de grade analytique acidifiée par 0.2% d'acide formique et sur la voie B d'un mélange méthanol/acétonitrile (8 :2 v/v) acidifié par 0.2% d'acide formique, voir tableau ci-contre :

Temps (min)	Débit (mL.min⁻¹)	A%	B%
0	0.40	95	5
1	0.40	95	5
4.00	0.40	0	100
6.00	0.40	0	100
7.00	0.40	95	5
9.00	0.40	95	5

Tableau 6 : Description de la méthode d'élution employée pour la séparation et la quantification des sidérophores BB et DHBA

Les paramètres pour la spectrométrie de masse ont été optimisés, voir tableau 7, par infusion directe de la solution de standard de bacillibactine (Cedarlane) et de DHBA (SIGMA) à 10 µg.mL⁻¹. L'analyse a été

faite avec une source par ionisation electrospray (ESI) en mode positif et les ions fragmentés ont été générés par MRM.

Capillaire	2.5 Kv	LM 1	2.8
Extracteur	3 V	HM 1	14.7
Temp Source	150 °C	Energie ion 1	0.5
Temp désolvatation	550 °C	LM 2	3
Débit gaz cône	50 L/h	HM 2	15
Débit gaz désolvatation	800 L/h	Energie ion 2	0.5
Débit gaz collision	0.22 mL/min	Multiplicateur	504

Tableau 7 : Paramètres de la source utilisés pour la quantification des sidérophores BB et DHBA

Deux transitions ont été analysées, la plus abondante servant pour la quantification et la seconde pour confirmation. Le traitement des données est effectué sur un logiciel MassLynx (Waters Corporation). Aucun effet de matrice significatif n'a été observé et la courbe de calibration a été faite à partir de 6 points de calibration. La LOQ mesurée était de 20 ng.mL⁻¹ de surnageant et de 1µg.g⁻¹ de biomasse. Les pourcentages de recouvrement obtenus lors des extractions SPE ont été calculés pour les diverses cartouches utilisées et sont rapportés dans le tableau de l'Annexe 8.

CHAPITRE 3. METHODES D'ISOLEMENT DES CELLULES BACTERIENNES DE LA MATRICE D'UN BIOFILM ET LEURS QUANTIFICATIONS

3.1. Notes préliminaires :

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été publiés en 2019 sous la forme d'informations supplémentaires de l'article Rizzi *et al.* (2019) *Applied and Environmental Microbiology* 85 (3). Les modifications effectuées dans ce chapitre par rapport à la version publiée sont de nature typographique. Seule la responsabilité de l'étudiant est engagée dans les modifications effectuées. La présentation de ces données dans un chapitre annexe aux matériels et méthodes est un choix dû à leur importance pour la réalisation et la compréhension des autres expériences présentées dans ce mémoire aux chapitres 4 et 5.

Auteurs et affiliations :

Adrien Rizzi ^{1,2}, Sébastien Roy ², Jean-Philippe Bellenger ¹, Pascale B. Beauregard ^{2*}.

¹ Centre SÈVE, Département de chimie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

² Centre SÈVE, Département de biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

3.2. Introduction :

Afin de soutenir la recherche proposée, il était nécessaire de mesurer précisément trois paramètres ; la production de biofilm, la croissance cellulaire et les quotas intracellulaires en Fe. La quantification de la production de biofilm bactérien a déjà été démontrée comme possible grâce à une souche qui produit la protéine fluorescente YFP lors de l'expression des gènes codant pour la production de la matrice extracellulaire. Afin de compléter cette méthode, deux approches ont été développées pour permettre de quantifier les cellules bactériennes ainsi que leurs quotas intracellulaires en fer au cours du temps. À noter que pour ce dernier point, si la quantité de fer par échantillon peut être mesurée par ICP-MS, il faut ensuite la rapporter à une quantité de cellules présentes dans ce même échantillon.

Les méthodes normalement employées pour la quantification cellulaire en microbiologie, soit les unités formatrices de colonies (UFC) et la densité optique à 600 nm (DO), présentent chacune leurs avantages, mais également des inconvénients les rendant difficilement applicables pour ce projet de recherche, en raison des contraintes liées à la croissance en biofilm. En effet, jusqu'à maintenant aucune courbe de croissance de *B. subtilis* en biofilm n'a été publiée. La quantification cellulaire par UFC nécessite des bactéries vivantes, ce qui n'est pas en adéquation avec l'impératif de tuer les cellules afin de conserver la protéine fluorescente YFP intacte pour la quantification de la formation du biofilm par cytométrie de flux. Quant à la méthode de quantification par DO, elle est fortement affectée par les agrégats cellulaires se formant lors de la formation de biofilm chez *Bacillus subtilis*.

Pour répondre à ces contraintes, une méthode basée sur la quantification du phosphore comme proxy du nombre de cellules a été développée. Le phosphore est important pour de nombreuses composantes cellulaires, comme les phospholipides des membranes, les molécules de stockage de l'énergie (ATP, GTP) ou encore pour les sucres phosphatés formant le squelette de l'ADN et de l'ARN. Ainsi, le phosphore est un élément principalement structural dont la concentration cellulaire est relativement constante et imposée par la stœchiométrie élémentaire de l'espèce considérée. La quantification du phosphore cellulaire comme proxy de la quantité cellulaire a été employée avec succès dans quelques études ^{54,55}. Cette approche a l'avantage d'être compatible avec la fixation des cellules pour la mesure de l'expression de la protéine YFP, car elle ne nécessite pas de cellules vivantes. Elle présente l'avantage supplémentaire de reposer sur la même méthode d'analyse élémentaire (ICP-MS) que les analyses des quotas cellulaires en Fe. La double quantification de la quantité de cellules (proxy P) et des concentrations intracellulaires en Fe sur le même échantillon est idéale pour la caractérisation de l'homéostasie du fer. En effet, l'analyse de ces deux paramètres sur les mêmes échantillons réduit grandement les incertitudes liées à l'utilisation de deux méthodes distinctes et de deux échantillons. La clef du succès pour l'implémentation d'une telle méthode a été de développer une procédure d'isolation et de lavage des cellules de la matrice extracellulaire qui conserve l'intégrité des cellules pour la cytométrie de flux et qui évite toute contamination (perte d'élément cellulaire ou contaminant par des résidus de matrice) avant l'analyse élémentaire par ICP-MS. Ainsi, cette méthode d'isolation se devait de répondre à 3 critères essentiels :

- (i) Les cellules doivent être mortes et fixées afin de conserver la fluorescence de la protéine YFP intacte, cette protéine étant un rapporteur de la production de biofilm.

- (ii) Les cellules doivent être isolées de la matrice extracellulaire pouvant complexer des métaux tout en préservant leur intégrité pour ne pas influencer l'évaluation des quotas intracellulaires.
- (iii) Les cellules doivent être lavées afin d'éliminer les atomes de fer précipités et les adduits à la surface des cellules sans interférer avec les métaux intracellulaires.

Ce chapitre présentera, dans un premier temps, la méthode développée ainsi que les contrôles effectués pour la validation de la méthode au niveau de la solubilisation de la matrice extracellulaire et de la lyse cellulaire. Dans un second temps, les données permettant la quantification du nombre de cellules en utilisant la mesure du phosphore seront présentées.

3.3. Méthode d'isolement et le lavage des cellules :

3.3.1. Protocole :

À des intervalles de temps régulier, durant une croissance dans des plaques multipuits, les cellules ont été collectées dans des tubes de 15 mL et séparées de leur surnageant par centrifugation (Beckman Coulter TM Adventi centrifuge J-25I avec un rotor JLA 16,250, à 6500 g à température pièce pendant 7 min). Les culots cellulaires ont été resuspendus dans 1 mL de paraformaldéhyde (PF) à 4% (4% PF dans un tampon phosphate salin) et incubés à température pièce pendant 7 minutes. Cette étape a permis la fixation des cellules afin de conserver l'intégrité de la protéine fluorescente YFP (prérequis A). Les cellules ainsi fixées ont ensuite été centrifugées (6500 g, 20°C, 7 min). Le culot a été resuspendu dans 1 mL d'une solution d'oxalate/EDTA (0.1 M/0.05 M) et incubé à température pièce pendant 7 minutes. Cette étape de lavage à l'oxalate-EDTA est inspirée des travaux de Tang et Morel ⁵⁶ et vise à séquestrer et solubiliser les métaux-traces qui pourraient être piégés dans la matrice du biofilm et à la surface des cellules sans interférer avec les quotas intracellulaires. Elle permet également de laver les traces de paraformaldéhyde restant. Les cellules ont ensuite été centrifugées (6500 g, 20°C, 7 min) puis resuspendues dans 5 mL de NaCl 0.5 M. A ce stade, les cellules peuvent être séparées afin d'effectuer des analyses en parallèle sur le même échantillon : cytométrie de flux pour la quantification des cellules exprimant la protéine YFP

(A) et analyse élémentaire (B) pour la quantification du nombre de cellules (proxy P) et des quotas intracellulaires en Fe.

Quantification des cellules exprimant la protéine YFP (A) 1 mL de la solution cellulaire dans du NaCl 0.5 M a été centrifugé à 13300 g pendant 2 min (Fisher Scientific AccuSpin Micro17). Le culot a ensuite été resuspendu dans 1 mL de GTE (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 20 mM Tris pH8) et stocké à 4°C avant l'analyse par cytométrie de flux. Cette dernière doit s'effectuer à l'intérieur de 3 jours afin d'éviter la dégradation de la protéine et la perte du signal YFP.

Analyse élémentaire (B) 4 mL de la solution cellulaire dans du NaCl 0.5 M ont été soniqués à l'aide d'un Q125-Sonicator (puissance 20%, 10 pulsations de 1 sec avec un espace de 1 sec) afin de dissocier les cellules prises en agrégats. Du NaOH a ensuite été ajouté pour atteindre une concentration finale de 0.1 M, ce qui permet la solubilisation de la matrice du biofilm. L'incubation a été faite à température pièce pendant 5 min. À cette étape, un temps d'incubation supérieur ou égal à 20 min a mené lors des tests préliminaires à une lyse des cellules. La matrice du biofilm solubilisée a été séparée des cellules par centrifugation (6500g, 20°C, 7 min). Le culot a ensuite été lavé avec 1 mL d'oxalate/EDTA (0.1 M /0.05 M) pendant 7 min puis une autre fois par une solution diluée d'oxalate/EDTA (0.025 M/0.0125 M) pendant 5 min. Les cellules ont ensuite été culotées par centrifugation (6500g, 20°C, 7min) et stockées à 4°C jusqu'à l'analyse par ICP-MS.

3.3.2. Validation de la méthode :

3.3.2.1. La solubilisation de la matrice :

Ce contrôle a été effectué afin d'examiner si nos traitements étaient efficaces pour supprimer la matrice extracellulaire, ou du moins les métaux qui lui étaient complexés, afin d'éviter les contaminations en métaux pouvant affecter les analyses élémentaires.

Pour ce faire, nous avons utilisé 9 réplicats de la souche sauvage (WT) qui ont été cultivés dans un milieu MSgg pendant 25 h afin d'obtenir un biofilm mature et robuste pouvant être collecté. A ce stade, 3 surnageants ont été conservés et notés M1. Les cellules ont ensuite été fixées au PF et centrifugées (6500 xg, 20°C, 7 min). 3 surnageants (S1) et 3 culots (T1) ont alors été mis de côté. Les 6 culots restants ont été resuspendus dans du NaCl et soniqués. Ensuite, 3 culots ont été mis de côté (T2). Les 3 autres réplicats

ont été repris dans du NaCl, avec du NaOH comme décrit dans le protocole, et culotés par centrifugation. A ce stade, le surnageant (S3) et les 3 culots (T3) ont été conservés. Chaque échantillon a été observé par microscopie optique pour la détection d'agrégation cellulaire (ce qui révélerait la présence de matrice résiduelle) et testé pour ses propriétés de complexation du Fe par un test colorimétrique CAS et un test colorimétrique de Arnow. Les résultats présentés dans le tableau (8) montrent que les cellules ayant subi le traitement complet (T3) ne présentent aucun signe d'agrégation ni d'activité de chélation métallique.

Echantillons	Test CAS	Test de Arnow	Agrégats cellulaires
M1	+++	+++	NA
S1	++	++	NA
T1	+	+	++
T2	+	-	+
S3	-	-	NA
T3	-	-	-

Tableau 8 : Résultats des tests CAS, Arnow et la présence d'agrégats cellulaires vérifiés par microscopie optique. (-) absence, + (présence), ++ (forte présence), +++ (très forte présence)

3.3.2.2. La lyse cellulaire :

Plusieurs contrôles ont été effectués pour valider qu'il n'y avait pas de perte significative d'éléments par la lyse cellulaire durant les différentes étapes de notre protocole d'isolement et de lavage. Dans un premier temps, nous avons vérifié que les étapes de sonication et d'ajout de NaOH ne causaient pas de lyse cellulaire et donc de perte de contenu métallique par les cellules. Pour ce faire, le double mutant *epsA-OtasA* a été utilisé pour son incapacité à produire un biofilm bactérien, afin d'éviter toute possibilité de biais de résultats par un effet de complexation métallique par la matrice du biofilm. Succinctement, 9 réplicats ont été traités de la manière suivante :

3 réplicats ont subi les étapes de fixation au PF, et lavés deux fois par la solution d'oxalate-EDTA

3 réplicats subissant les étapes de fixation au PF, lavés une fois par la solution d'oxalate-EDTA, resuspendus dans le NaCl, soniqués et lavés à nouveau avec l'oxalate EDTA.

3 réplicats subissant l'ensemble du processus, à savoir fixation au PF, lavage par oxalate-EDTA, reprise dans le NaCl, sonication, rajout du NaOH puis lavage par oxalate-EDTA.

Les 9 réplicats ont ensuite été digérés sur un SCP Science Digiprep Jr avec 1 mL d'acide nitrique à 65°C pendant 45 min. Après la digestion, chaque tube a été complété à 10 mL avec de l'eau MilliQ et les échantillons ont été analysés pour la quantification de leur contenu en phosphore, manganèse, magnésium et fer sur une ICP-MS, thermo scientific XSerie2 voir chapitre 2 matériels et méthodes pour plus d'informations.

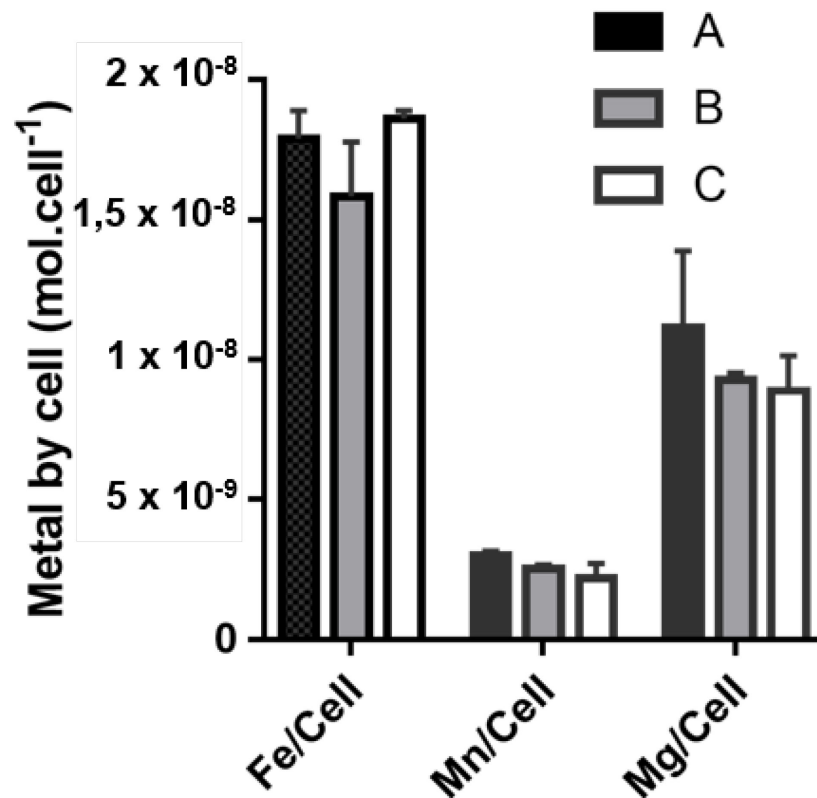


Fig 12. Figure extraite des informations supplémentaires de Rizzi *et al.* (2019). Concentration cellulaire en Fe, Mn et Mg de la souche sauvage de *Bacillus subtilis* (WT) après divers traitements : (A) Cellules fixées, (B) cellules fixées et soniquées, et (C) cellules fixées, soniquées et traitées au NaOH. Les données ont été rapportées en mol.cell⁻¹.

Comme montré sur la figure 12, il n'y a pas de différences significatives entre les traitements A, B ou C, indiquant l'absence de perte significative de la concentration intracellulaire pour les éléments testés.

3.4. Quantification des cellules:

Afin de quantifier les cellules, j'ai opté pour une quantification cellulaire via un proxy phosphore qui est couramment employé dans le cadre d'études de la composition en microélément cellulaire^{54,55}. Cette méthode permet ainsi d'avoir une méthodologie de quantification non influencée par la matrice du biofilm ou des agrégats cellulaires, et qui peut être effectuée en concomitance de l'analyse des concentrations en fer des échantillons.

Pour développer cette méthode, les cellules ont été mises en culture dans un milieu MSgg à 30°C pendant 28 h comme décrit dans le matériel et méthode. Toutes les 3 heures, les cellules ont été collectées en triplicata. Les cellules ont été traitées comme décrit dans le protocole d'isolation des cellules à des fins d'analyses élémentaires (voir ci-dessus). A la fin du processus, les cellules ont été resuspendues dans 5 mL de NaCl 0.5 M. 1 mL de cette suspension a été utilisé pour déterminer la densité cellulaire (cell par mL) via une chambre de comptage type Petroff-Hausser avec un microscope inversé à fluorescence Zeiss Z1-Observer en utilisant une illumination DIC (40x). Chaque échantillon a été dénombré 3 fois. Les 4 mL restants ont été digérés puis analysés par ICP-MS pour quantifier la concentration en P cellulaire comme décrit précédemment.

La figure 13 rapporte la concentration en P cellulaire mesurée par ICP-MS en fonction du nombre de cellules mesurées par comptage. Ces résultats montrent une forte corrélation entre ces deux paramètres et supportent notre hypothèse que le P cellulaire peut être utilisé comme proxy de la densité cellulaire dans nos conditions expérimentales à savoir des croissances de *B. subtilis* dans un milieu minimum Mmsg entre 13h et 30h de croissance à 30°C sans agitation. Cette courbe est applicable pour les mutants de *B. subtilis* 3610 employés dans cette étude, mais pas pour d'autres souches de *B. subtilis* ou d'autres espèces bactériennes.

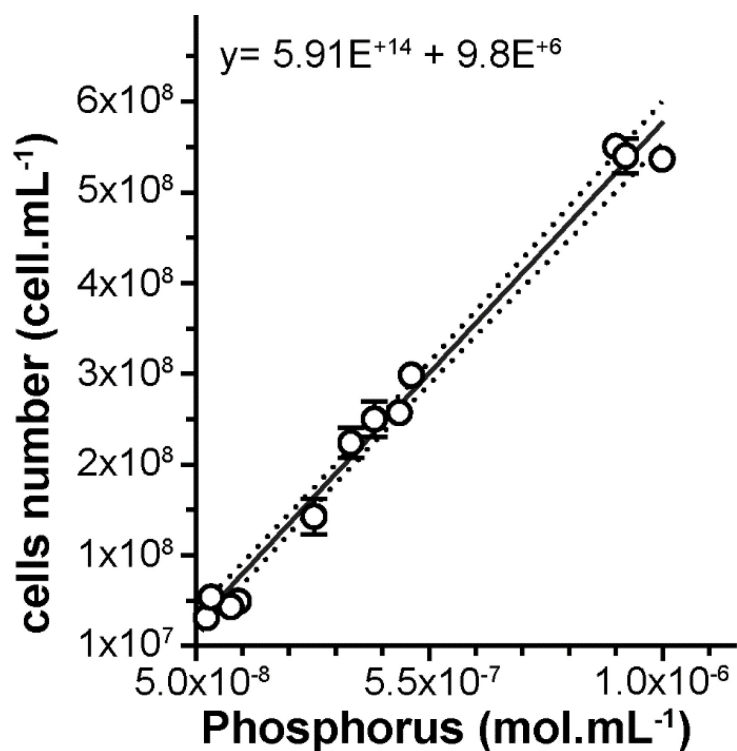


Fig 13. Figure extraite des informations supplémentaires de Rizzi *et al.* (2019). Régression linéaire entre le phosphore intracellulaire (en mol. mL⁻¹) mesuré par ICP-MS et la densité cellulaire de *Bacillus subtilis* mesurée par microscopie sur un microscope Z1-observer avec une chambre de Petroff Hausser (en cell.mL⁻¹). La ligne noire représente la régression linéaire avec un $R^2 = 0.98$ et les pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95%

3.5. Conclusion :

Nous avons pu mettre en place un protocole répondant à notre cahier des charges et permettant l'isolement des cellules de *Bacillus subtilis* de sa matrice extracellulaire sans entraîner de contamination en métaux par la matrice ni de perte d'éléments par lyse cellulaire. Cette méthode nous permet de mesurer sur le même échantillon la production du biofilm (expression de la protéine YFP par cytométrie de flux), la densité cellulaire (quantification du P par ICP-MS) et les quotas intracellulaires en Fe (quantification du

Fe par ICP-MS). Cette méthode est un outil essentiel pour la caractérisation efficace de l'homéostasie du Fe par des cellules formant un biofilm.

CHAPITRE 4 : L'HOMÉOSTASIE DU FER CHEZ BACILLUS SUBTILIS REQUIERT LA PRODUCTION DE SIDEROPHORES MAIS AUSSI LA FORMATION DE BIOFILM.

4.1. Avant-propos :

Ce chapitre a été publié dans « Applied and Environmental microbiology » sous les références : Rizzi et al. (2019). doi: 10.1128/AEM.02439-18.

Les modifications effectuées dans ce chapitre par rapport à la version publiée sont de natures typographiques. Seule la responsabilité de l'étudiant est engagée dans les modifications effectuées.

4.1.1. Auteurs et affiliations :

Auteurs et affiliations : Rizzi Adrien^{1,2} , Sébastien Roy², Jean-Philippe Bellenger¹ et Pascale B. Beauregard ^{2*}

1. Centre Sève, Département de chimie, Université de Sherbrooke, J1K 2R1, Qc, Canada

2. Centre Sève, Département de biologie, Université de Sherbrooke, J1K 2R1, Qc, Canada

4.1.2. Présentation de l'article

Les biofilms bactériens exhibent diverses propriétés physico-chimiques susceptibles d'affecter l'efficacité des sidérophores, d'avoir un impact direct sur l'homéostasie métallique des microorganismes, mais cela reste peu caractérisé. Cette étude a pour but d'étudier comment les biofilms bactériens peuvent impacter l'homéostasie du Fer. Pour ce faire la production de sidérophore, de biofilm et l'évolution des quotas intracellulaires du fer au cours d'une croissance bactérienne d'un organisme modèle pour les bactéries à Gram positifs *Bacillus subtilis* furent mesurés dans diverses conditions de stress en Fe. L'utilisation de mutants de *Bacillus subtilis* ne produisant pas de biofilm ou ne produisant pas de sidérophores a permis d'observer plus précisément les interactions de ces deux composants sur la gestion

de l'homéostasie du fer chez *Bacillus subtilis*. Les sidérophores sont-ils, comme dans le cas des cultures sous agitation, le principal vecteur d'acquisition du fer ou le biofilm joue-t-il un rôle également ?

4.1.3. Contribution de chaque auteur

Adrien Rizzi, Jean-Philippe Bellenger et Pascale. B Beauregard ont conçu cette étude et les protocoles expérimentaux. Adrien Rizzi a effectué les expériences, les comptages cellulaires et les analyses élémentaires. La quantification des sidérophores BB et DHBA a été effectuée par Lounès Haroune. Adrien Rizzi a préparé le plan de rédaction ainsi que les figure et table de l'article. Jean-Philippe Bellenger a rédigé la première version de l'article. Adrien Rizzi, Jean-Philippe Bellenger et Pascale. B Beauregard ont commenté et modifié les versions suivantes.

Les références sont incluses dans la section références en fin de manuscrit.

4.2. Article: Iron Homeostasis in *Bacillus subtilis* requires siderophore production and biofilm formation

4.2.1. Abstracts :

Iron (Fe) is the most important metal in biology. Despite its abundance, Fe is mostly present as a ferric form in soils, strongly limiting its bioavailability. To overcome the challenge of Fe acquisition, many microorganisms produce siderophores to retrieve Fe from natural sources. Another ubiquitous feature of bacteria in natural environments is biofilm formation. Previous studies showed that external Fe strongly influenced biofilm formation in several bacteria, suggesting that this microenvironment plays a mechanistic role in micronutrient acquisition for bacteria. Here, we applied a complementary set of analytical methods and deletion mutants to evaluate the role of biofilm formation, siderophore production, and their interaction in Fe homeostasis in *Bacillus subtilis*. We observed that Fe homeostasis, i.e., active growth at a constant intracellular Fe concentration, requires both siderophore production and biofilm formation. Also, we report that in *B. subtilis*, both biofilm formation and siderophore production are required to achieve active Fe acquisition from the medium and to sustain normal growth. Furthermore, we provide evidence that the formation of biofilm slightly enhances the kinetics of Fe complexation by catechol siderophores and markedly improves siderophore use efficiency. These results provide new perspectives on the mechanism underlying siderophore-based acquisition of Fe in biofilm-forming bacteria.

4.2.2. Importance :

Iron acquisition is of fundamental importance for microorganisms, since this metal is generally poorly bioavailable under natural conditions. In the environment, most bacteria are found tightly packed within multicellular communities named biofilms. Here, using the soil Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, we show that biofilm formation and the production of siderophores, i.e., small molecules specifically binding metals, are both essential to ensure Fe uptake from the medium and maintain cellular Fe homeostasis. The biofilm matrix appears to play an important role favoring the efficient usage of siderophores. Taken together, our results demonstrate a close link between biofilm formation and iron

acquisition in *B. subtilis*, allowing a better comprehension of how bacteria can cope with metal limitation under environmental conditions.

4.2.3. Introduction:

Iron (Fe) is one of the most important metals for all living organisms ⁵⁷ and one of the most abundant metals in Earth's crust and soils ^{3,58}.

However, under oxic conditions, Fe is predominantly present as hydroxide and oxide forms ⁵⁹. Common Fe oxides and hydroxides are characterized by very low solubility, not greater than 10^{-18} M at pH 7 ⁴, and slow dissolution kinetics ⁶⁰.

Most terrestrial organisms thus live in an Fe-rich environment with low Fe bioavailability. To solve this conundrum, organisms have developed different strategies to promote Fe acquisition from their surroundings ⁶¹. One of these strategies is the production of low-molecular-weight chelating agents with a high affinity for Fe, named siderophores ⁹. Siderophores, whose production is controlled by intracellular Fe deficiency, can enhance Fe availability by facilitating the dissolution of Fe oxides and competing with natural Fe complexes ^{10,62}.

Another important feature of most soil microorganisms is their capacity to form multicellular communities embedded in a self-secreted extracellular matrix, known as biofilms ¹⁷. Biofilms are ubiquitous in the environment and provide many advantages for the microbial communities, such as protection against environmental stresses and increased sharing of resources. Additionally, the extracellular biofilm matrix exhibits several chemical properties, which vary as a function of its structure and chemical composition. For example, biofilm matrix can sorb organic and inorganic compounds ¹⁴⁻¹⁶. Electron donor or acceptor activities have also been reported in certain biofilm matrices ¹⁴.

Biofilms from a large variety of bacteria, such as *Bacillus subtilis* ¹⁸, *Pseudomonas aeruginosa* ¹⁹⁻²¹, and *Staphylococcus aureus* ²², were shown to be regulated by the environmental concentration and chemical form of Fe. In *P. aeruginosa*, intracellular Fe status was suggested to play a significant role in biofilm development through Fur, a conserved iron-binding transcription regulator ¹⁹. The impairment of siderophore production via mutagenesis, or the addition of exogenous siderophores and other Fe-chelating agents in the culture medium, can decrease biofilm formation by *P. aeruginosa* ⁶³. In *B. subtilis*,

an increased concentration of extracellular FeCl_3 strongly promotes biofilm formation¹⁸, and deletion of the genes encoding the biosynthesis of the siderophore bacillibactin affects complex colony development⁶⁴. Recently, the presence of exogenous siderophores was reported to promote sporulation in *B. subtilis*, a cellular pathway controlled by the same transcriptional regulator as biofilm formation⁶⁵. The sum of these observations not only clearly shows that biofilm formation and Fe acquisition are closely related but also suggests that biofilm formation might play an important mechanistic role in the siderophore-assisted acquisition of Fe in biofilm-forming bacteria.

Here, we applied a complementary set of analytical methods and deletion mutants to study how biofilm formation and siderophore production interact to support Fe homeostasis and growth in the model bacterium *Bacillus subtilis*. Our data indicate that in *B. subtilis*, both biofilm formation and siderophore production are essential to sustain Fe acquisition and Fe homeostasis. Our data also show that the kinetics of Fe complexation by catechol siderophores is slightly improved in the presence of biofilm. More importantly, we report that the presence of a biofilm significantly increases the acquisition of Fe-siderophore complexes. These results provide new perspectives on the mechanism underlying Fe acquisition by biofilm-forming bacteria.

4.2.4. Matériels et méthodes :

4.2.4.1. Strains and mutant construction:

The *Bacillus subtilis* strains used in this study are listed in Table S1 in the supplemental material. *B. subtilis* strain NCIB3610 was used as the wild type due to its capacity to form a robust biofilm, and the mutants were constructed in this genetic background. The *dhbA-F::erm* deletion mutant was constructed using the long flanking homology PCR technique. The primers used were as follows (5'→3'): P155, ATG CCA ACA GCC CAA TCG AA; P156, GAG GGT TGC CAG AGT TAA AGG ATC CTT GGG CAG CCC CTG TTA TAA A; P157, CGA TTA TGT CTT TTG CGC AGT CGG CTG GCT CAA ATC GGC AAG GTT; and P158, CGT ATT ACA GGT GCG CCA TCA A. PCR products for gene deletions were introduced in *B. subtilis* strain 168 by natural competence⁶⁶.

The genetic deletion was then transferred to the strain NCIB3610 or other appropriate mutant strains by SPP1-mediated generalized transduction⁶⁷.

4.2.4.2. Preculture and biofilm formation:

To prepare the inoculum for biofilm formation, *B. subtilis* cells were precultured from glycerol stocks for 18 h on LB (Lennox broth) agar plates at 37°C. Colonies were harvested from the LB plates and suspended in 50 ml of MSgg medium without iron to generate an inoculum at an optical density at 595 nm (OD₅₉₅) of 1 ± 0.05 . Of note, these precultures achieved cellular Fe concentrations significantly higher than metabolic minimum needs. For all experiments, the inoculum was prepared in LB, allowing the cells to reach 4.1×10^{-18} mol Fe · cell⁻¹. The biofilm medium used throughout this study was MSgg without iron (5 mM potassium phosphate buffer [pH 7], 0.1 M MOPS [morpholinepropanesulfonic acid] [pH 7], 2 mM MgCl₂, 0.05 mM MnCl₂, 0.001 mM ZnCl₂, 0.002 mM thiamine, 0.5% glycerol, 0.5% glutamate, 0.7 mM CaCl₂)³⁹. Milli-Q deionized water was used to prepare the medium. Prior to the medium preparation, the glassware was washed for 24 h with a 10% solution of HCl (trace metals reagent) and rinsed three times with Milli-Q water to prevent iron contamination of the MSgg. When indicated, iron was added in the medium from a sterile solution of FeCl₃, and the final FeCl₃ concentration is specified in the legend of each figure. To induce biofilm formation, the wells of sterile 6-well plates were filled with 4.8 ml of MSgg medium with the selected amount of FeCl₃ (10⁻⁴ M) and inoculated with 150 µl of the *B. subtilis* inoculum suspension (time zero). Incubations were performed at 30°C (30 h, static).

4.2.4.3. Cells isolation and analysis:

The methodology and controls for cell isolation and analysis, including the measurement of growth rates, are detailed in the methods in the supplemental material. (voir chapitre 3)

4.2.4.4. P_{tapA}-yfp reporter and flow cytometry analysis:

The analysis of biofilm formation was performed using flow cytometry and an *amyE::P_{tapA}-yfp* reporter, which consists of a fusion between the promoter of the biofilm-induced *tapA* matrix gene and the YFP (yellow fluorescent protein)-encoding gene. When biofilm formation is triggered, a subpopulation of cells will produce the biofilm matrix and thus express the YFP, which can be detected by flow

cytometry^{43,68}. The increase in the percentage of YFP-positive cells correlates with the increase in the biofilm (pellicle) weight (see Fig. annexe 1). For flow cytometry analysis, cells in GTE (described in the methods section of the supplemental material) were sonicated with a Q125 sonicator (power 20%, 10 pulses of 1 s with 1-s pauses) and diluted in phosphate-buffered saline (PBS) to obtain an event rate of 300 to 800 events per second. Data collection was performed with a BD FACSJazz using a 488-nm laser. Data analysis was performed using BD software; the gates were created such that the first one encompasses only the fluorescent population while the second encompasses the population of all bacteria, which was set to 20,000 events.

4.2.4.5. Elemental analysis:

Cells were digested on an SCP science Digiprep Jr with 1 ml of nitric acid (trace metals grade; Fisher Chemical) at 65°C for 45 min. After digestion, each tube was filled to 10 ml with Milli-Q water. Samples were analyzed for phosphorus and metal contents on an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS XSeries 2; Thermo Scientific) as previously described⁶⁹.

4.2.4.6. Siderophore extraction and quantification:

Bacillibactin was quantified as described in reference⁵³. Briefly, bacillibactin was extracted, purified by solid-phase extraction (HLB cartridges; Waters), and quantified using ultra-high-pressure chromatography coupled to a triple-Quad mass spectrometry (Acquity UPLC-TQ-MS, XEVO; Waters Corporation, Milford, MA). More details on bacillibactin extraction, purification, and analysis are presented in Tables 6, 7 and annexe 8 and the methods in the supplemental material.

4.2.4.7. Fe complexation by the catechol siderophores:

Complexation of freshly precipitated Fe (10^{-5} M FeCl_3) by bacillibactin (10^{-5} M) in water was monitored over time by UV-visible (UV-Vis) spectrometry (Genesys 10S; Thermo Scientific). Experiments on Fe complexation by a catechol siderophore in the presence of biofilm were performed at a high concentration

of ligand (10^{-4} M) to overcome the spectral interferences of the biofilm matrix. Due to the limited commercial availability of bacillibactin, we used azotochelin, a biscatechol from *Azotobacter vinelandii*, as a model catechol siderophore. Azotochelin was synthesized as described previously^{70,71}. The *B. subtilis dhbA-F* mutant (deficient in siderophore production) was grown in the presence of 10^{-4} M FeCl_3 and 10^{-5} M desferrioxamine E (DefE; Cedarlane, Burlington, Ontario, Canada) to obtain a catechol siderophore-free biofilm. After biofilm establishment (22 h after inoculation), 10^{-4} M azotochelin was added to the medium, and the formation of Fe-azotochelin complex was monitored by UV-Vis spectrometry (Genesys10s; Thermo Scientific).

4.2.4.8. Statistical analysis:

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 7. The comparison shown in Fig. 18 was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA; $P < 0.05$).

Comparisons shown in Fig. 15 and 17 were determined in at least triplicate using Student's *t* tests ($P < 0.05$).

4.2.5. Results:

4.2.5.1. Biofilm formation, siderophore production, and Fe homeostases.

To examine how biofilm formation and siderophore production influence Fe homeostasis, we first characterized intracellular Fe concentrations, siderophore (bacillibactin and DHBA [2,3-dihydroxybenzoic acid]) production, and biofilm induction during the growth of *B. subtilis* in the presence of 10^{-4} M FeCl_3 . We used a *B. subtilis* strain bearing the biofilm reporter P_{tapA} -yfp, a transcriptional fusion between the promoter of the matrix gene *tapA* and the gene encoding yellow fluorescent protein (YFP). This construction was introduced at the *amyE* locus, and consequently, the expression of YFP is concomitant with matrix gene expression but does not interfere with it. The expression of the matrix gene can be followed by evaluating the percentage of YFP-positive cells in a population by using flow cytometry (see Materials and Methods for details). Because of cell clumping and matrix production, cell growth in a biofilm cannot be efficiently monitored using optic density or cell enumeration techniques.

Thus, we used cellular phosphorus quantitation as a proxy for cell quantification (see Fig. 13 and methods in the supplemental material).

As shown in Fig.14.A the YFP reporter—and thus, biofilm formation—was expressed when cells reached a density of approximately 3×10^7 to 5×10^7 cells \cdot ml⁻¹, corresponding to 19 to 20 h after inoculation. Our measurements of bacillibactin and DHBA concentrations showed that their amounts were relatively constant (2.9×10^{-17} mol \cdot cell⁻¹ \pm 4.3×10^{-18} mol \cdot cell⁻¹ and 5.6×10^{-16} mol \cdot cell⁻¹ \pm 1.4×10^{-17} mol \cdot cell⁻¹, respectively) throughout growth Fig.14.B. Since preculture was performed on a complex medium (Lennox broth [LB]), our analyses of intracellular Fe levels demonstrate that cells contained large amounts of intracellular Fe, likely exceeding minimum physiological needs, in the hours following inoculation (Fig.14.C). In the early stage of growth (from 13 to 15 h, up to a density of 2×10^7 cells \cdot ml⁻¹) (see Annexe 9), bacterial cells were actively producing siderophores but not biofilm (Fig.14.A and B).

Despite this active production of siderophores, we observed a steady decrease in intracellular Fe concentrations with increasing cell numbers. However, this sharp decrease in intracellular Fe levels stopped at the mid stage of growth (\sim 19 to 22 h; 5×10^7 to 1×10^8 cell density \cdot ml⁻¹) despite active growth, showing that cells had reached a homeostasis equilibrium for Fe (i.e., active bacterial growth at constant intracellular Fe concentration of $\sim 4 \times 10^{-18}$ mol_{Fe} \cdot cell⁻¹).

This stabilization in intracellular Fe concentrations corresponded to biofilm formation, suggesting that the presence of both siderophores and biofilm is required to support Fe homeostasis.

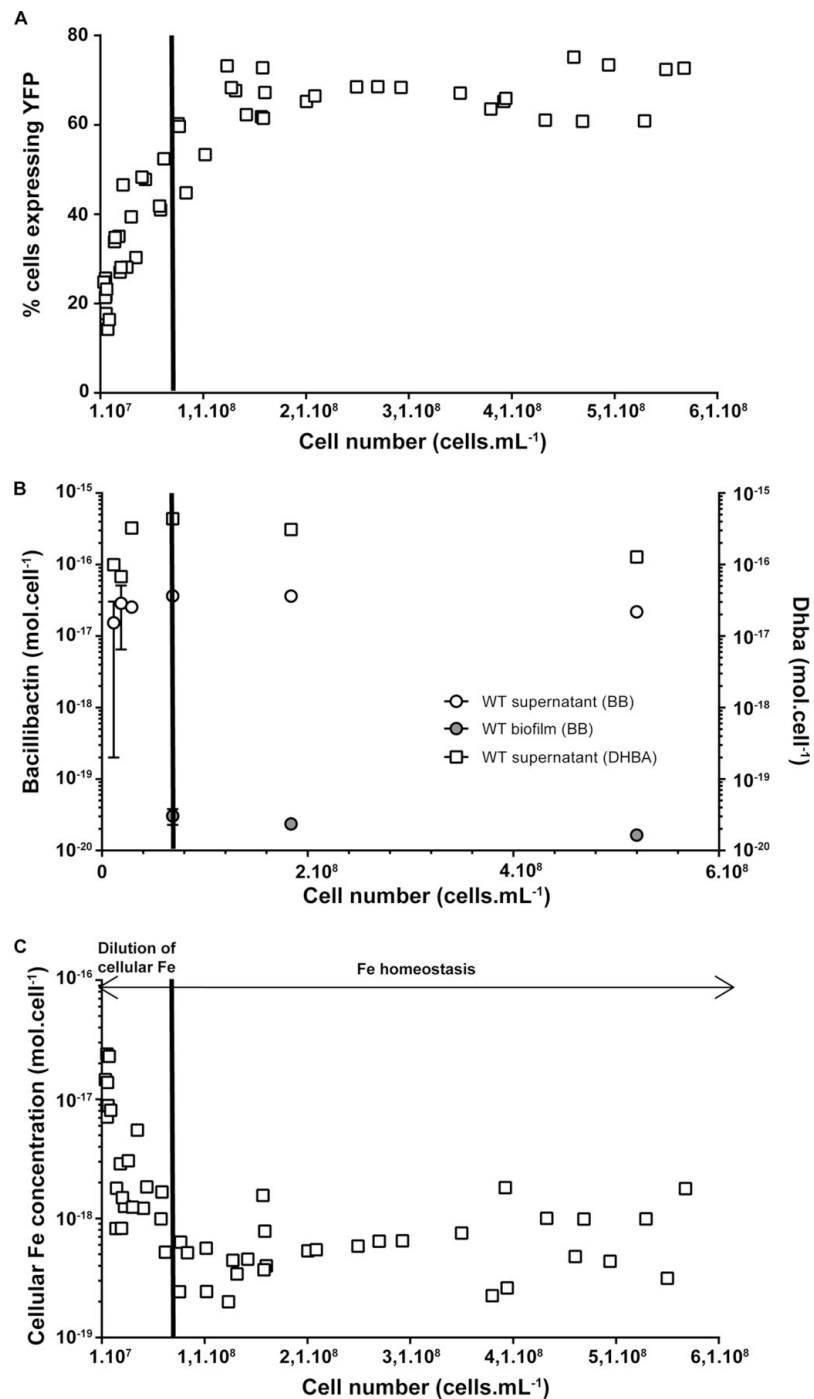


FIG 14 Biofilm induction, siderophore production, and cellular Fe quotas during the growth of *B. subtilis* 3610 P_{tapA} -yfp grown at 30°C in a static MSgg medium supplemented with 10⁻⁴ M FeCl₃.

(A) P_{tapA} -yfp induction; phosphorus quantification was used as a proxy for cell quantification (see Fig. 13). (B) Siderophore production

(circles represent bacillibactin production and squares are for the production of DHBA).

(C) Intracellular Fe concentration. Results are the means from the three biological replicates, and error bars represent standard deviations.

4.2.5.2. Siderophores and biofilm are both required to sustain bacterial growth and Fe acquisition.

To further examine the importance of siderophore production and biofilm formation for *B. subtilis* Fe homeostasis under our conditions, we compared the growth of *B. subtilis* wild type with the growth of two mutants, one deficient for biofilm formation (with deletions of the *epsA-epsO* operon and the *tasA* gene [*epsA-O tasA*]) and the other deficient for siderophore production (with a deletion of the *dhbA-dhbF* operon [*dhbA-F*]), in MSgg medium supplemented with 10^{-4} M FeCl₃. As shown in (Fig.15.A) the growth of both mutants was significantly decreased compared to that of the wild type. Indeed, wild-type cells achieved significantly higher cellular densities at mid and late stages of growth in static liquid MSgg than both the *epsA-O tasA* and *dhbA-F* mutants.

These low cellular densities for the mutants reflect low growth rates, since wild-type (WT) cells achieved a higher exponential growth rate ($\mu = 0.317 \pm 0.017 \text{ cell} \cdot \text{h}^{-1}$) for a longer period of time (up to 27 h) than both the *epsA-O tasA* and *dhbA-F* mutants ($\mu = 0.211 \pm 0.015 \text{ cell} \cdot \text{h}^{-1}$ and $0.197 \pm 0.007 \text{ cell} \cdot \text{h}^{-1}$ up to ~23 h for the *epsA-O tasA* and *dhbA-F* mutants, respectively) (see Annexe 10). The growth rates of the WT were not significantly different before and after biofilm induction (~19 h), while for both mutants, bacterial growth was drastically reduced after ~23 h ($\mu < 0.03$ and $0.08 \text{ cell} \cdot \text{h}^{-1}$ for the *epsA-O tasA* and *dhbA-F* mutants, respectively). Importantly, the *epsA-O tasA* mutant exhibited growth identical to that of the wild type under nonbiofilm conditions (in MSgg with shaking at 150 rpm) (see Annexe 6), showing that this growth defect is solely associated with biofilm formation and not another feedback pathway.

Taken together, these results strongly suggest that both siderophore production and biofilm formation are required to support normal bacterial growth in static liquid MSgg.

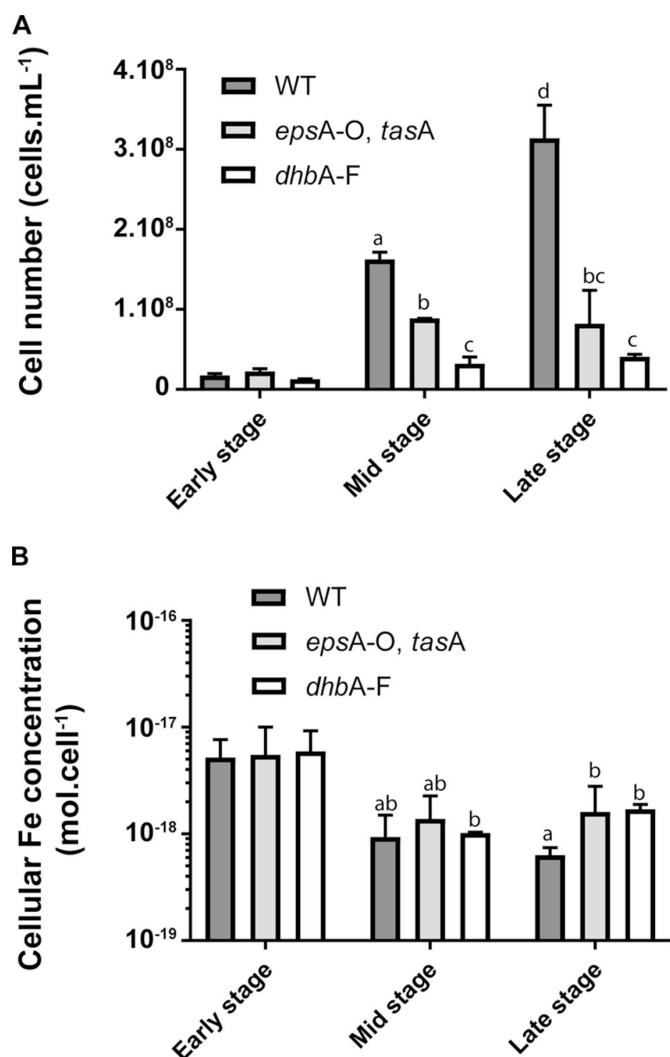


Fig 15. Effects of siderophore production and biofilm formation on bacterial growth and intracellular Fe concentration. Bacterial density (A) and intracellular Fe concentrations (B) of *B. subtilis* WT, *epsA-O tasA*, and *dhbA-F* strains. Phosphorus quantification was used as a proxy for cell quantification (Fig. 13). Results are the means from the three biological replicates, and error bars represent standard deviations. Strains were grown at 30°C in MSgg medium supplemented with 10⁻⁴ M FeCl₃. Lowercase letters indicate significant differences (P < 0.05).

Since the siderophore-deficient and the biofilm-deficient mutants displayed impeded growth in an iron-rich medium (10⁻⁴ M FeCl₃), we examined if this phenotype was related to Fe homeostasis. In wild-type cells, the rate of decrease in intracellular Fe was consistent with the rate of cell division, suggesting that cellular Fe stocks significantly contribute to growth during the early stage of growth Fig.14 and 15. Such consumption of intracellular Fe stocks might explain the active growth of the mutant strains in the early stage of growth (compare Fe cellular concentrations between early and mid-stages for the three strains) (Fig.15.B).

At mid stage, all strains reached similar intracellular Fe concentrations ($\sim 4 \times 10^{-18} \text{ mol}_{\text{Fe}} \cdot \text{cell}^{-1}$). This value is close to the Fe requirement for heterotrophic bacteria reported by Tortell et al. (1.55×10^{-18} to $2.16 \times 10^{-18} \text{ mol}_{\text{Fe}} \cdot \text{cell}^{-1}$ ⁷²). However, wild-type cells producing both biofilm and siderophores were able to sustain active growth, while the growth of the *epsA-O tasA* and *dhbA-F* mutants, unable to produce biofilm and siderophores, respectively, stopped. Based on these observations, we hypothesized that in the early stage, cell division is primarily supported by the consumption of cellular Fe stocks and that little or no Fe is taken up from the external medium. At mid stage, when Fe cellular stocks have been consumed, wild-type cells are able to support growth through the active acquisition of Fe from the medium, while mutants fail to do so and stop growing due to Fe limitation.

We tested this hypothesis by monitoring Fe acquisition before and after biofilm formation (mid stage) by using the pure stable ^{57}Fe isotope, whose natural abundance is $\sim 2\%$. Cells preconditioned in the presence of naturally occurring Fe ($\sim 92\% \text{ } ^{56}\text{Fe}$, $\sim 2\% \text{ } ^{57}\text{Fe}$) were inoculated in a growth medium containing pure ^{57}Fe as a sole source of Fe ($10^{-4} \text{ M } ^{57}\text{Fe}$). This enabled us to track both the dilution of intracellular Fe, using the ^{56}Fe signature of the preconditioned cells, and the acquisition of new Fe from the medium, using the ^{57}Fe of the inoculation medium as a signature. As shown in Fig.16, before biofilm formation (early stage and mid stage ante biofilm formation), both ^{56}Fe and ^{57}Fe intracellular concentrations decreased with growth. This confirms that in the early stage, there was no significant acquisition of Fe from the medium and that the intracellular Fe concentration primarily reflects the dilution of initial Fe stocks with cell division. After biofilm formation (mid-stage post biofilm formation and late stage), the ^{57}Fe concentration significantly increased, and ^{57}Fe constituted the essential intracellular Fe at the end of growth.

This result confirms that active acquisition of Fe from the medium happened after biofilm formation, and this acquisition was required to support the Fe needed for cell division. Overall, these observations confirm our hypothesis that the biofilm is required for active acquisition of Fe from the medium by *B. subtilis* in static MSgg cultures.

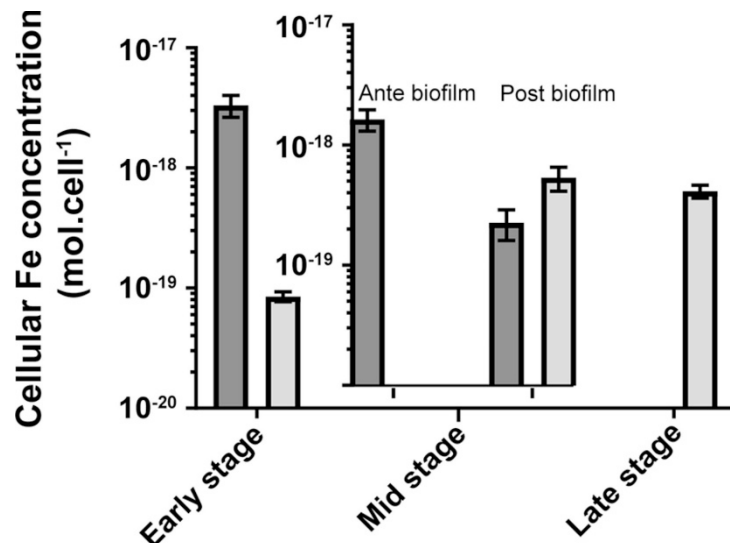


Fig 16. Acquisition of iron from the medium by *B. subtilis* during growth. Bars show intracellular concentrations of ⁵⁷Fe (gray) and ⁵⁶Fe (dark gray). Cells were grown at 30°C in MSgg medium supplemented with 10⁻⁴ M of ⁵⁷Fe. Results are the means from the three biological replicates, and error bars represent standard deviations.

4.2.5.3. Biofilm formation contributes to the siderophore-mediated uptake of Fe.

While low Fe acquisition and impeded growth were predictable for the *dhbA-F* mutant, which lacks the essential siderophore for Fe uptake, the absence of significant uptake of Fe by the *epsA-O tasA* mutant was more surprising. Since bacillibactin production appears to be essential for sustained cell growth in MSgg with 10⁻⁴ M FeCl₃, the growth impediment of the biofilm-deficient mutant (Fig.15) might also have been caused by a lack of siderophore production. We observed that in the early stage of growth, the wild type and the *epsA-O tasA* mutant had the same bacillibactin production rates (~10⁻¹⁷ mol · cell⁻¹, up to 13 h) (see Annexe 5). However, at mid stage (after 19 h), concomitantly with biofilm development in wild-type cells, bacillibactin production rates significantly decreased in the biofilm-deficient mutant while they remained roughly constant in wild-type cultures.

This likely reflects the inability of Fe-starved *B. subtilis epsA-O tasA* cells to invest more resources in siderophore biosynthesis. To further investigate if the lower siderophore synthesis of *epsA-O tasA* at mid stage explained the Fe acquisition defect, we monitored the effect of bacillibactin addition on the growth

of mutants deficient for biofilm formation (*epsA-O tasA* mutant) or siderophore production (*dhbA-F* mutant).

Bacillibactin was added 13 h after inoculation at 10^{-5} M, corresponding to the concentration measured in wild-type cultures at the end of exponential growth (see Annexe 4). As expected, both biofilm formation and growth (Fig.17 see also Annexe 3) of the *dhbA-F* mutant were restored roughly 9 h after the addition of bacillibactin. Growth rates after bacillibactin addition were comparable to the rates measured during exponential phase in the wild type (Fig.17).

However, growth of the *epsA-O tasA* mutant was only partially restored by the addition of bacillibactin (Fig.17), confirming that the lack of siderophore production by this mutant is not the main reason for the growth arrest. Similarly, complementation of the *epsA-O tasA* mutant with an excess amount of bacillibactin-Fe complex restored growth to only approximately 30% (see Annexe 2).

This result demonstrates that indeed, the growth defect of the *epsA-O tasA* mutant under our conditions was largely due to a defect in Fe acquisition and suggests the incapacity to efficiently recover Fe-bacillibactin.

Taken together, these observations suggest that in liquid standing MSgg, the sole production of siderophores is insufficient to achieve the Fe acquisition required for normal growth (Fig.15 and 17) and that biofilm formation significantly improves the retrieval of Fe-siderophore complexes from the medium. Since the *epsA-O tasA* mutant was only defective in extracellular matrix production and not in the genetic regulation leading to biofilm formation, it is very likely that these extracellular components play an important role in iron uptake.

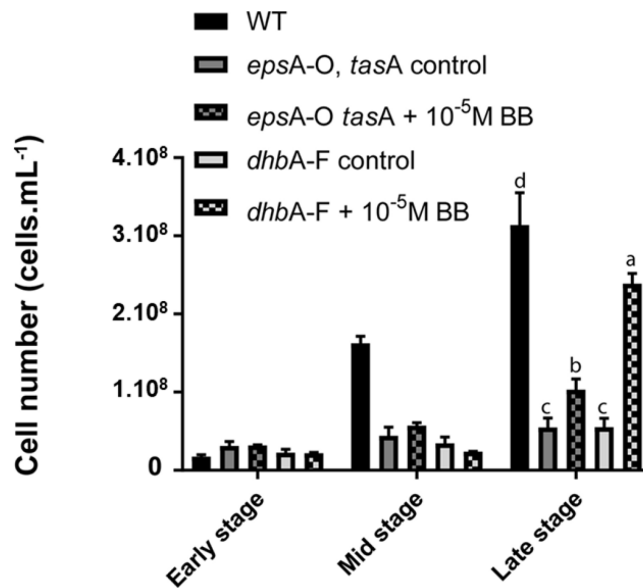


Fig 17. Effect of bacillibactin addition on the growth of *B. subtilis* WT and *dhbA-F* and *epsA-O tasA* mutants.

Bars represent cell densities of *dhbA-F* and *epsA-O tasA* mutants in the presence (square patterns) and absence (solid patterns) of 10⁻⁵ M bacillibactin addition compared to that of the WT. Results are the means from three biological replicates, and error bars represent standard deviations. Strains were grown in at 30°C in MSgg medium supplemented with 10⁻⁴ M FeCl₃. Lowercase letters indicate significant differences (P < 0.05).

4.2.5.4. Complexation of Fe by catechol siderophores and Fe-siderophore complex acquisition efficiency.

It is known that kinetics are a major constraint to siderophore-mediated acquisition of Fe ⁶². We hypothesized that biofilm formation promotes Fe complexation kinetics, thus increasing Fe acquisition efficiency. To examine this, we measured Fe-catechol siderophore formation in the presence and absence of biofilm. Because of commercial constraints, we used the model siderophore azotochelin (a biscatechol produced by *Azotobacter vinelandii*), which possesses a structure analogous to that of bacillibactin. We also used a *dhbA-F* strain to which desferrioxamine E was added to induce the formation of a

bacillibactin-free biofilm to ensure that bacillibactin would not interfere with Fe-azotochelin complex formation and measurement. As shown in Fig.18, Fe complexation by bacillibactin was slightly improved in the presence of biofilm. While significant, this small difference (~8% of the Fe-azotochelin complex formed after 3h; compare the plus biofilm column with the minus biofilm column in Fig.18) is unlikely to solely explain the contrasting responses of the siderophore-deficient mutant and the biofilm-deficient mutant to bacillibactin addition.

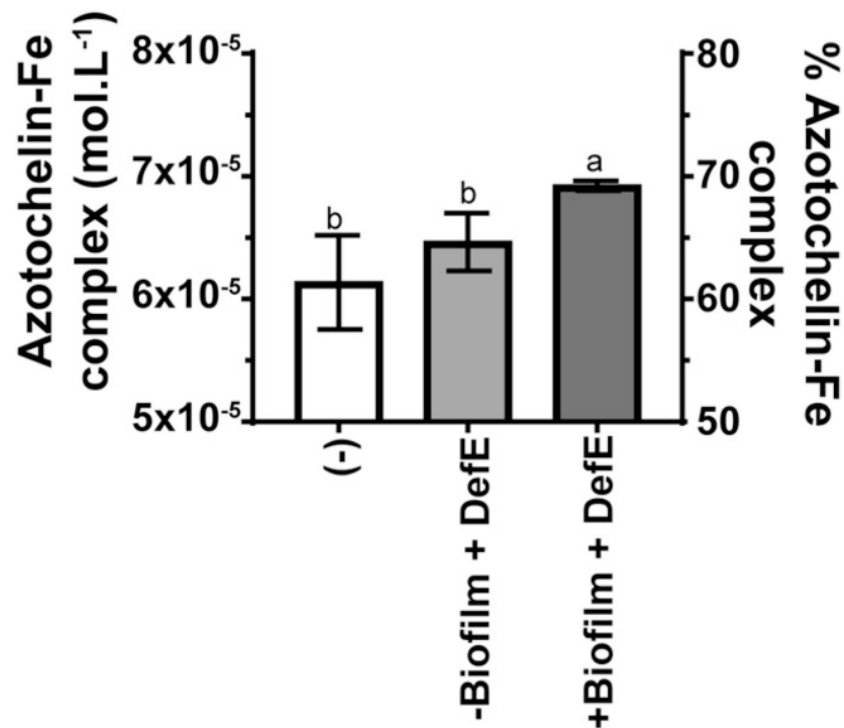


Fig 18. Complexation of Fe by the biscatechol siderophore azotochelin in the presence and absence of biofilm.

Fe-azotochelin complex formation was monitored by UV-Vis spectrometry 3 h after the addition of 10^{-4} M azotochelin. Complexation was assayed in MSgg medium (-), MSgg medium supplemented with 10^{-5} M DefE (-biofilm+DefE), and in the *dbhA-F* mutant cultured in MSgg medium supplemented with 10^{-5} M DefE (+biofilm+DefE)

4.2.6. Discussions :

Our data show that in static culture, Fe homeostasis, i.e., a constant intracellular Fe concentration sustaining bacterial growth, is only reached in *B. subtilis* cells producing both siderophores and biofilms.

Under our conditions, biofilm significantly improves the siderophore-mediated acquisition of Fe. This might be due to the presence of a densely packed community in the biofilm. Indeed, Völker and Wolf-Gladrow proposed that siderophore efficiency increases with cell density⁷³.

Because siderophores have a very high affinity for Fe, low concentrations of siderophores such as those found in soil ($<10^{-7}$ M⁷⁴) are, from a thermodynamic point of view, sufficient to promote Fe recruitment from insoluble oxides and other natural Fe complexes. Yet, slow Fe dissolution kinetics can constrain siderophore-mediated acquisition of Fe⁶². We observed a slight increase in Fe complexation by catechol siderophores in the presence of a biofilm (Fig.18), suggesting that it might provide a microenvironment promoting Fe complexation. Of note, exopolysaccharides have been shown to influence Fe speciation in biofilm compared to that in the supernatant¹⁵, which might favor complexation by siderophores. In soils, where Fe is present in crystalized minerals (e.g., hematite and goethite) and in strong Fe-organic matter complexes, biofilm-promoted Fe complexation kinetics might play important roles in Fe acquisition and homeostasis. However, the gain of complexation efficiency was not solely responsible for the important increase in siderophore use efficiency we observed in the presence of biofilms.

It was recently demonstrated that biofilms of *P. aeruginosa* and *Laminaria digitata* can scavenge Fe, which can then be used by cells^{15,16}. Trapping Fe hydroxides and oxides particles in the biofilm matrix likely prevents further condensation of oxides, which in return would facilitate Fe recruitment by siderophores. Also, many gradients have been reported in biofilms (e.g., pH, oxygen, metabolite concentration, and electric oscillation)^{75,76}, which might promote the recruitment of Fe-siderophore complexes from the external medium. As presented in Annexe 4, bacillibactin concentrations were comparable in the medium and in the biofilm, but our analytical methods did not enable us to distinguish between apo-siderophores and metal-siderophore complexes. Thus, more research will be required to examine how biofilm properties (physical structure and chemical composition) might promote Fe-siderophore acquisition. Nonetheless, our data support the theory that the biofilm provides microenvironmental conditions stimulating an efficient recruitment of Fe from hydroxides, oxides, and other natural Fe complexes by siderophores.

Finally, our study highlighted the contrasting efficiencies in siderophore-mediated Fe acquisition between shaken and static cultures. In the presence of similar Fe concentrations, the bacterial growth rates of wild-type and *epsA-O tasA* mutant cells were similar in shaken cultures (Annexe 6), while in static cultures, the absence of biofilm resulted in severely impeded growth by the *epsA-O tasA* mutant, even in the

presence of siderophore addition (Fig.15 and 17). Static cultures face challenges, such as the distance between cells and Fe sources, the diffusion of siderophores and Fe-siderophore complexes in the medium, that shaken cultures do not encounter. Many studies on Fe homeostasis and siderophore-mediated acquisition of Fe by soil bacteria have been performed in shaken cultures^{77,78}. Thus, the importance of the interplay between siderophore production and extracellular matrix production to support efficient Fe acquisition and Fe homeostasis might have been overlooked. Considering that static growth in a biofilm is a highly relevant growing state for many soil bacteria, more research on metal acquisition and homeostasis by model soil bacteria in static cultures is required to draw a more comprehensive picture of the role of biofilm production in siderophore use efficiency and metal homeostasis.

4.2.7. Acknowledgments :

We thank Lounes Haroune for his help with the quantification of bacillibactin.

This project was supported by the Fond de Recherche du Québec Nature et Technologies through a Partenariat pour l'Innovation grant and the Canadian Research Chair in boreal biogeochemistry.

CHAPITRE 5: BACILLUS SUBTILIS MODULE SON UTILISATION DU FER LIES A SA MATRICE EN FONCTION DE LA BIODISPONIBILITE DU FER DANS LE MILIEU

5.1. Avant-propos :

Ce chapitre a été soumis pour publication dans «Environmental microbiology» et est présentement sous processus de relecture par les reviewers. Les modifications effectuées dans ce chapitre par rapport à la version soumise sont de natures typographiques et insertion des figures au bon endroit. Seule la responsabilité de l'étudiant est engagée dans les modifications effectuées.

5.1.1. Auteurs et affiliations :

Auteurs et affiliations : Rizzi Adrien^{1,2}, Sébastien Roy², Pascale B. Beauregard ² et Jean-Philippe Bellenger^{1*}

1. Centre Sève, Département de chimie, Université de Sherbrooke, J1K 2R1, Qc, Canada

2. Centre Sève, Département de biologie, Université de Sherbrooke, J1K 2R1, Qc, Canada

5.1.2. Présentation de l'article

Nous venons de montrer dans le précédent chapitre que le biofilm bactérien joue un rôle essentiel dans l'acquisition et la gestion du fer par *Bacillus subtilis* en culture statique, son absence conduisant à une incapacité d'internaliser le fer et de croître même en présence de sidérophores. Ces observations suggèrent que le biofilm joue un rôle indispensable à l'acquisition du Fe assistée par sidérophores. Il existe deux contraintes majeures à l'acquisition de Fe assistée par sidérophores en milieu naturel ; les cinétiques lentes de complexation et les pertes de sidérophores par diffusion. Comme discuté dans le chapitre précédent, le biofilm pourrait contribuer à résoudre ses contraintes en limitant la perte de

sidérophore et en amélioration les cinétiques de complexation. La parution d'articles rapportant la présence de fer complexe dans des biofilms naturels et des observations internes au laboratoire (annexe 7) de la présence de granules jaunâtres, pouvant être du fer, dans le biofilm soulève deux nouvelles questions :

Le biofilm bactérien de *Bacillus subtilis* complexe-t-il du fer dans sa matrice extracellulaire et si oui en quelle quantité ? La bactérie a-t-elle accès à ce fer pour sa nutrition minérale et cette acquisition depuis le biofilm est-elle dépendante de la disponibilité du Fe extramatricielle? Répondre à ces questions permettra de déterminer si le biofilm est un micro-environnement autosuffisant pour les besoins en Fe des cellules. L'hypothèse de travail est que le biofilm agit comme une macro-chromatographie piégeant le fer dans un environnement proche de la bactérie que celle-ci peut miner, par l'intermédiaire de la production de sidérophores ou d'autres mécanismes, pour acquérir son Fe.

En utilisant des isotopes du fer (56, 57 et 54) il fut entrepris de déterminer la provenance du fer internaliser (biofilm, ou milieu extérieur) au cours d'une croissance bactérienne dans différentes conditions de disponibilité du Fer.

5.1.3. Contribution de chaque auteur

Adrien Rizzi, Jean-Philippe Bellenger et Pascale. B Beauregard ont conçu cette étude et les protocoles expérimentaux. Adrien Rizzi a effectué les expériences et les analyses élémentaires. Adrien Rizzi a rédigé la première version de l'article. Adrien Rizzi, Jean-Philippe Bellenger et Pascale. B Beauregard ont commenté et modifié les versions suivantes.

Les références sont incluses dans la section références en fin de manuscrit.

5.2. *Bacillus subtilis* modulates its usage of biofilm-bound iron in response to environmental iron availability

5.2.1. Abstract:

Iron (Fe) is one of the most important micronutrient for all life forms on earth. While abundant in soil, Fe bioavailability in oxic soil is very low. In environmental conditions, bacteria need to acquire enough Fe (iron) to sustain growth while limiting the energy cost of siderophore synthesis. Biofilm formation might mitigate this Fe stress, since it was shown to accumulate Fe in certain Gram-negative bacteria. Here we use a ubiquitous biofilm-forming soil bacterium, *Bacillus subtilis*, and stable Fe isotopes to precisely evaluate the origin of Fe during growth in the presence of tannic acid and hydroxides, used as proxies for different environmental conditions. We report that *B. subtilis* biofilms can accumulate a large quantity of Fe in the biofilm, largely exceeding Fe associated with cells. We also report that only a fraction of biofilm-bound Fe is available for uptake in the absence of other sources of Fe in the vicinity of the biofilm. We observed that availability of environmental Fe modulates the usage of this pool of biofilm-bound Fe. Finally, our data suggest that consumption of biofilm-bound Fe relates to the efficacy of *B. subtilis* to transport Fe from the environment to the biofilm, possibly through siderophores. These results provide important insights into the management of biofilm-bound and environmental Fe (i.e., Fe outside the biofilm matrix) by *Bacillus subtilis* in response to Fe stress.

5.2.2. Introduction :

Iron (Fe) is one of the most important elements for all microorganisms⁵⁷. Despite its high abundance in the earth crust and soil^{3,58}, the low solubility of its common mineral forms (hydroxides and oxides) in oxic conditions, not greater than 10^{-18} M at pH7⁴ results in very scarce bioavailability. To acquire Fe in bioavailable Fe poor environments, microorganisms produce organic ligands with a high affinity for Fe called siderophores⁹. Siderophores increase Fe availability by facilitating the dissolution of Fe oxides and competing with natural Fe-complexes (i.e., organic matter)⁶². Presence of multicellular communities embedded in self-secreted matrices, or biofilms, is another important characteristic of most soil microorganisms¹⁷. Biofilms provide many advantages for the microbial communities such as protection

against environmental stress ¹⁴. Importantly, biofilm formation and Fe acquisition are strongly intertwined. Fe availability (extracellular concentration and chemical form) has been shown to affect biofilm production and maturation in several bacteria, including the Gram-positive *Bacillus subtilis* ^{18,79}. Reciprocally, the formation of a biofilm could contribute to Fe acquisition. We recently showed that in *Bacillus subtilis*, both siderophore production and biofilm formation are required to support Fe acquisition from the medium and sustain Fe homeostasis during growth in static cultures ⁸⁰. The extracellular biofilm matrix exhibits a wide range of properties (e.g. pH, redox potential, composition) ¹⁴⁻¹⁶ that could influence metal speciation, siderophore efficiency and facilitate metal uptake. In natural habitats, Fe sources in the vicinity of biofilm forming bacteria are very diverse (e.g. minerals, organic matter, xenosiderophores) ⁸¹ and Fe availability likely quickly evolve due to changes in water content, pH and redox conditions in the bacterial microenvironment. Biofilm can sorb organic and inorganic compounds, including Fe ¹⁴⁻¹⁶. Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* were shown to accumulate important quantity of Fe that can be mobilized and taken up by the bacteria, possibly through siderophore complexation ¹⁶. The presence of Fe in the biofilm matrix could help bacteria to cope with Fe stress by offering a local alternative to environmental Fe sources. However, it is still unclear if and to what extent the amount of Fe accumulated in the biofilm can sustain growth, and if the mobilization of this local Fe pool is modulated by the availability of environmental Fe (i.e., Fe outside the biofilm matrix). Here, we investigated how bacteria manage biofilm-bound Fe and environmental Fe sources to sustain Fe acquisition using the model bacterium *B. subtilis*. Our main objectives were (i) to quantify the accumulation of Fe by *B. subtilis* biofilms, (ii) to evaluate if the biofilm-bound Fe can be mobilized and to what extent it can support bacterial growth, and (iii) to test if the usage of biofilm-bound Fe is modulated by the efficiency of cells to recruit Fe from environmental sources.

5.2.3. Methods:

5.2.3.1. Strains, isotopic labeling of cells and biofilm

All experiments were conducted with *Bacillus subtilis* strains NCIB3610, except Fig.19 where strains SSB488 (3610 *epsA*-O::tet) (Branda et al., 2006) and CA017 (3610 *tasA*::kan) (Vlamakis et al., 2008) were used. To prepare the inoculum for biofilm formation marked with intracellular ⁵⁶Fe, *B. subtilis* cells were pre-cultured from glycerol stocks for 5 hours at 37°C with shaking at 150 rpm in MSgg medium

containing 10^{-4} M of pure $^{56}\text{FeCl}_3$ (Trace Sciences International Corp. $^{56}\text{FeCl}_3$, 99% purity). Cells were diluted 1:25 and this pre-culture was repeated 3 times to insure maximum depletion of the other natural Fe isotopes. The culture was then diluted in 50 mL of MSgg medium without Fe to generate an inoculum of $\text{OD}_{595} = 1 \pm 0.07$. Biofilm medium used throughout this study was MSgg without iron (5 mM Potassium Phosphate buffer pH7, 0.1 M MOPS pH7, 2 mM MgCl_2 , 0.05 mM MnCl_2 , 0.001 mM ZnCl_2 , 0.002 mM thiamine, 0.5% glycerol, 0.5% glutamate, 0.7 mM CaCl_2) (Branda et al., 2001). Mili-Q deionized water was used to prepare the medium. Prior to medium preparation, glassware was washed for 24h with 10% solution of HCl (trace metals reagent), and rinsed three times with Mili-Q water to prevent Fe contaminations of the MSgg. To prepare the ^{57}Fe labeled biofilm, wells (15.5 mL) from sterile 6 wells plates were filled with a cell-culture insert (Fisher Scientific) and 4.8 mL of MSgg medium with 10^{-4} M of $^{57}\text{FeCl}_3$ (Trace Sciences International Corp. $^{57}\text{FeCl}_3$, 99% purity), and inoculated with 150 μL of the ^{56}Fe marked *B. subtilis* inoculum suspension (time zero) (Figure 20). Incubations were performed at 30°C until robust biofilm formation (~22h). As described previously (Rizzi et al., 2019), under these conditions growth is supported solely by the dilution of intracellular Fe stocks, in this case ^{56}Fe (see Fig. 20). Then the inserts containing ^{56}Fe labeled cells and ^{57}Fe labeled biofilm were sterilely transferred into new wells containing MSgg with no Fe or 10^{-4} M of pure ^{54}Fe (Trace Sciences International Corp. $^{54}\text{FeCl}_3$, 95% purity) provided as FeCl_3 or Fe-tannic acid complex. When indicated, Fe was added in the medium from a solution of isotopic $^{54}\text{FeCl}_3$ (HCl 37%) or pre-complexed with tannic-acid (1 hours). The final Fe concentration is specified in the legend of each figure. Finally, intracellular Fe content, and its isotopic identity, was analyzed after 0h, 3h and 6h.

5.2.3.2. Cells isolation and Fe analysis

The methodology and controls for cell and biofilm isolation and analysis are described in Rizzi et al. 2019⁸⁰. For elemental analysis, cells were digested on a SCP science Digiprep Jr with 1 mL of nitric acid (trace metals grade, Fisher Chemical) at 65°C for 45 min. After digestion, each tube was filled at 10 mL with Milli-Q water. Samples were analyzed for phosphorus and Fe content on an inductively-coupled-plasma mass spectrometer (ICP-MS; Thermo Scientific, XSeries2) as previously described⁸⁰. Cell number were determined based on cellular phosphorus content, which, under our experimental conditions, is linearly correlated to cell density in *B. subtilis*⁸⁰.

5.2.3.3. Fe complexation by bacillibactin

Complexation of freshly precipitated Fe (10^{-5} M FeCl_3) or pre-complexed Fe-tannic acid (10^{-5} M) by bacillibactin (10^{-5} M) in water was monitored over time by UV-visible (UV-Vis) spectrometry (Genesys 10S; Thermo Scientific) at 330 nm. Fe tannic Acid-Fe complexes were prepared by adding tannic acid and Fe in 1/1 ratio (10^{-4} M) in MiliQ water and let the complex for 2 hours at room temperature on a rotator shaker.

5.2.3.4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 7.

5.2.4. Results

5.2.4.1. Quantification of iron concentration in *Bacillus subtilis* biofilm matrix

The capacity of microbial biofilms to accumulate various metals, including Fe, was reported in laboratory settings and environmental samples for Gram-negative bacteria^{15,16,82,83}. Thus, our first objective was to examine if biofilms formed by the Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* could also accumulate Fe. As shown on Figure 19, under our experimental conditions large quantity of Fe are stored in *B. subtilis* biofilm collected after 22h of growth (close to 10^{-6} M, Fig. 19.A). To put this amount in perspective, after 22h of growth the amount of Fe associated with the biofilm matrix was an order of magnitude higher than the amount of Fe associated with all *B. subtilis* cells (close to 10^{-7} M, Fig. 19A). In an attempt to characterize which components of the biofilm matrix is involved in Fe sequestration, we examined the amount of Fe sequestered in *B. subtilis* deletion mutants *epsA*-O and *tasA* producing, respectively, only the protein (TasA) and exopolysaccharide (EPS) component of the biofilm. As shown on Figure 19B, under our experimental conditions both mutants accumulated similar amount of Fe in their incomplete biofilms

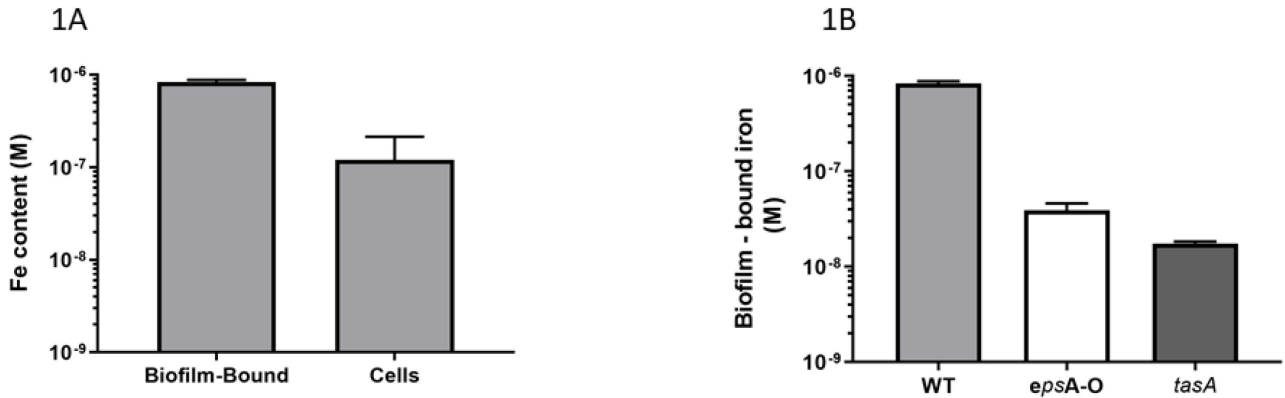


Fig 19. (Figure 1). *B. subtilis* biofilm accumulates Fe (A) Fe content (in M) was measured in *B. subtilis* cells and biofilm matrix after 22h of growth at 30°C in MSgg supplemented with 10⁻⁴ M of FeCl₃. (B) Fe content of biofilms formed by wildtype (light gray bars), *epsA-O* (no exopolysaccharides, white bars) and *tasA* (no TasA fibers, dark gray bars) measured after 22h of growth at 30°C in MSgg supplemented with 10⁻⁴ M of FeCl₃

(~2.9. 10⁻⁸ M and ~1.8 10⁻⁸ M for *epsA-O* and *tasA* respectively). Interestingly, the sum of Fe associated with the biofilms of mutants *epsA-O* and *tasA* (~4.7 10⁻⁸ M) only accounts for ~15% of the Fe associated with wildtype biofilms (Fig 19.A). These results suggest a synergic effect of biofilm components on Fe sequestration and that a complete and mature biofilm is required for optimal Fe binding.

5.2.4.2. Mobilization of biofilm-bound Fe by *B. subtilis*

Since high levels of Fe are present in the biofilm, we evaluated if it could be mobilized by *B. subtilis* to support its growth. To test this, we used a Fe stable isotope labeling of *B. subtilis* cells and biofilms. With this technique, we are able to obtain cells and biofilms containing only ⁵⁶Fe, which are then incubated in media depleted of Fe, or containing different form of ⁵⁷Fe. The contribution of Fe in cells, either from within (⁵⁶Fe) or from outside (⁵⁷Fe) the biofilm is then determined by analyzing the proportion of Fe isotopes in *B. subtilis* cells by ICP-MS (see Fig. 20 and Methods for details).

Figure 2

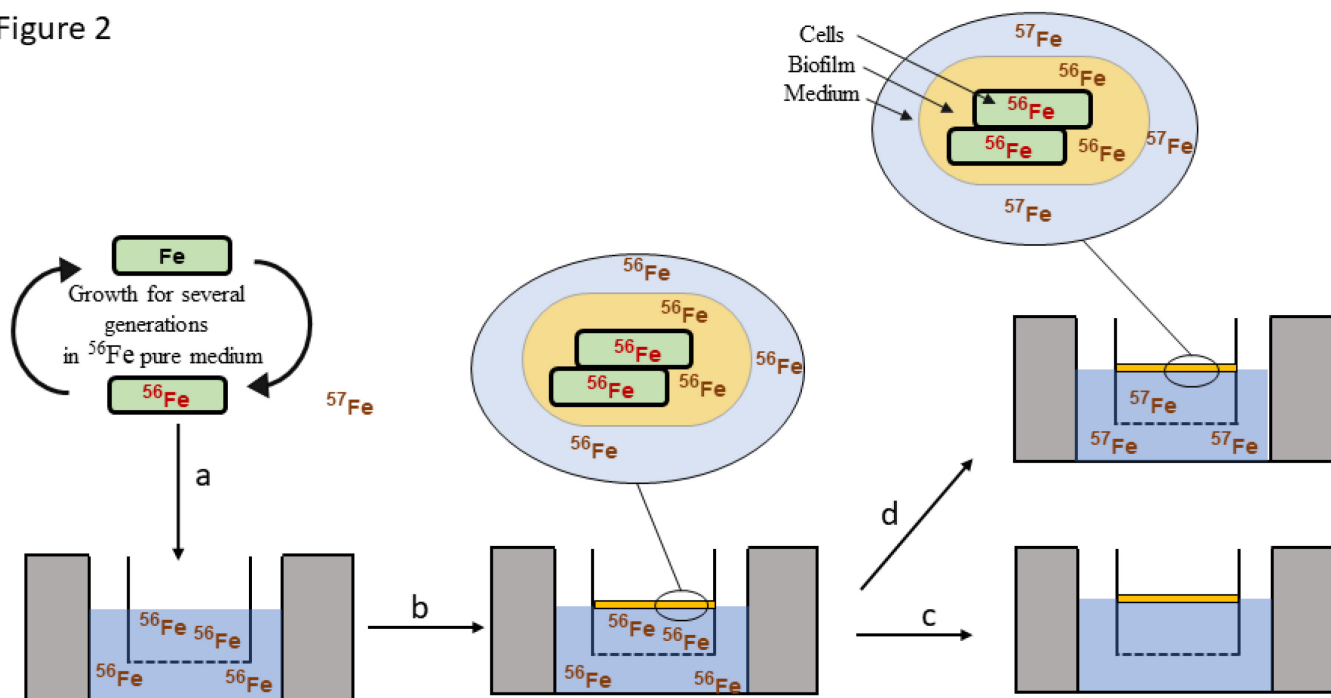


Fig 20. (Figure 2). Procedure for Fe isotopic labeling of *B. subtilis* cells and biofilms Cells were precultured at 30°C in liquid MSgg medium containing pure ^{56}Fe (10^{-4} M) for several generations to produced ^{56}Fe labelled cells (a), then cells were inoculated in a MSgg medium containing pure ^{56}Fe and grown for 22h to produce the ^{56}Fe -labeled robust biofilm (b). Following biofilm formation, the ^{56}Fe -labeled cells and biofilm were transferred in a new MSgg medium containing no Fe (c) or pure ^{57}Fe provided as FeCl_3 or Fe-tannic acid (d). Fe content (^{56}Fe and ^{57}Fe) in cells and cells + biofilm was monitored for 6 hours. Fe content in the biofilm matrix was calculated by subtracting cellular Fe to total biofilm Fe (cells + matrix). Acquisition of new Fe was calculated by subtracting the amount of cell bound Fe (number of cells x Fe cellular quotas) 6 hours after transfer to the amount of cell bound Fe at T0 (composed of 100% ^{56}Fe)

As shown in Figure 21.A, when the biofilm was transferred in a medium without Fe *B. subtilis* was still able to grow to some extent (“no Fe” condition). This growth was not accompanied by a significant decrease in intracellular Fe levels (Fig. 21.B, white bars), showing that cells were able to acquire Fe from the biofilm. Thus, biofilm-bound Fe can sustain Fe acquisition and homeostasis, i.e. constant intracellular Fe concentration despite cellular division, and active growth, in absence of environmental Fe.

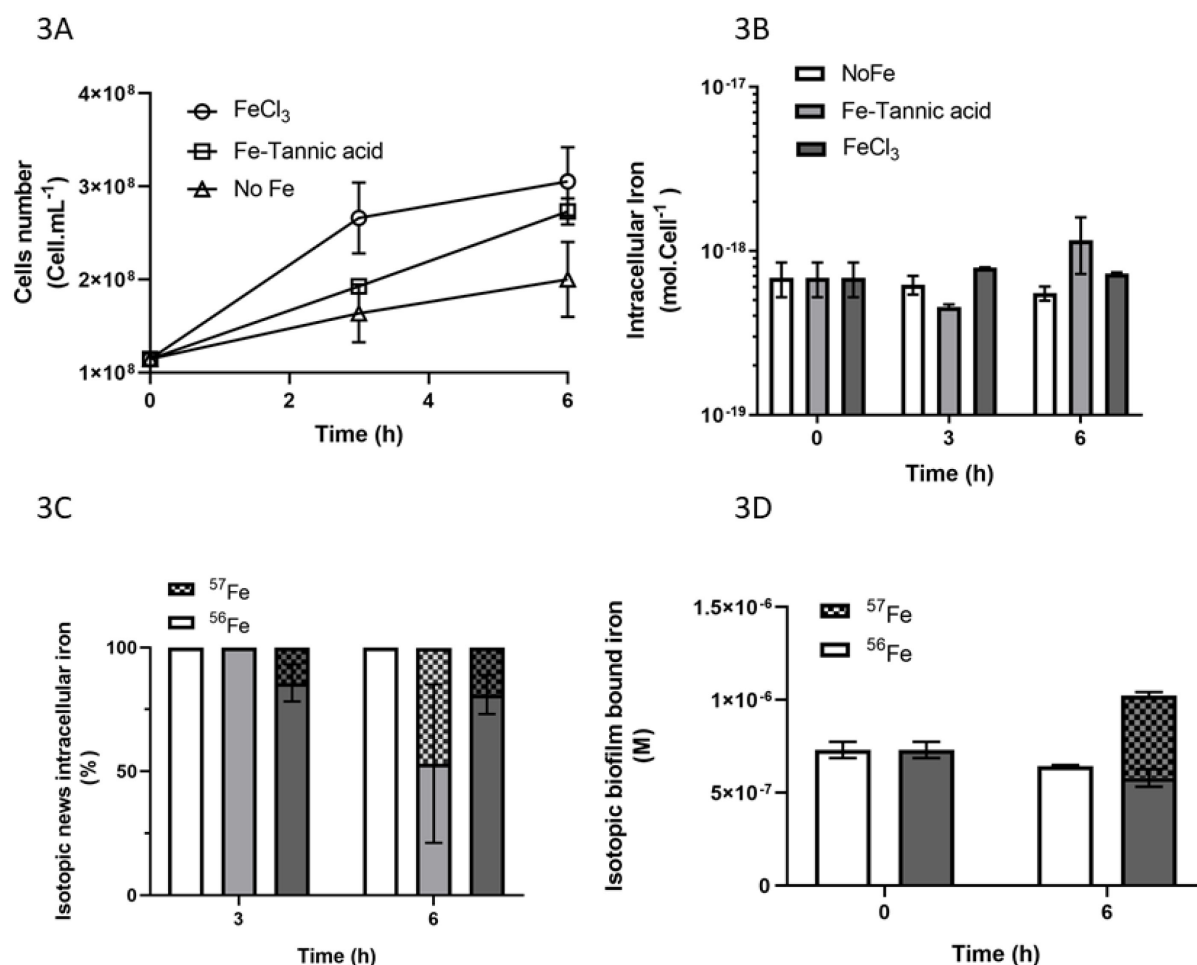


Fig. 21. Influence of environmental Fe on *B. subtilis* growth and Fe acquisition strategy. Panels show cellular growth (A), total intracellular Fe concentration (B), isotopic distribution of new cellular Fe (C), and isotopic composition of biofilm-bound Fe (D) of *B. subtilis* cells 3 and 6 hours after transfer in a MSgg medium containing no Fe (white bars), 10⁻⁴ M ⁵⁷FeCl₃ (light gray bars) or 10⁻⁴ M ⁵⁷Fe-tannic acid (dark gray bars).

However, the growth was significantly slower than cells grown in presence of environmental Fe (i.e., FeCl₃ and Fe-tannic acid, Fig. 21.A). Importantly, after 6 hours, the amount of Fe required to sustain growth (number of cells produced × cellular Fe quotas = $1.1 \pm 0.1 \times 10^{-7}$ M, Fig 21.A and 21.B) was consistent with the decrease in Fe content in the biofilm ($8.6 \pm 3.6 \times 10^{-8}$ M Fig. 3D). This result shows that biofilm-bound Fe can be taken up by the bacteria, but in absence of environmental Fe only a fraction of total biofilm-bound Fe can be mobilized for uptake, resulting in impeded growth.

5.2.4.3. Effect of environmental Fe on the acquisition of biofilm-bound Fe

Next, we evaluated to what extent the use of biofilm-bound Fe depends on the availability of environmental Fe. Biofilms grown in a ^{56}Fe medium were transferred in medium containing either freshly added 10^{-4} M $^{57}\text{FeCl}_3$ (a proxy for hydroxides) or 10^{-4} M ^{57}Fe tannic acid (a proxy for Fe-natural organic matter complex). Under both conditions (FeCl_3 and Fe-tannic acid) *B. subtilis* achieved active growth (Fig. 21.A) and Fe homeostasis (Fig. 21.B).

Cells grown in presence of FeCl_3 achieved higher growth rate and reached stationary phase faster than cells grown in presence of Fe-tannic acid (Fig. 21.A). Interestingly, in the presence of environmental $^{57}\text{FeCl}_3$, ^{57}Fe contributed less than 25% of the new Fe required for growth, while in presence of ^{57}Fe -tannic acid, it contributed to more than 50% (Fig. 21.C). Considering that 6 hours after transfer similar amount of cells (Fig. 21.A) containing similar cellular Fe concentration (Fig. 21.B) were produced, this result implies that cells mobilized close to twice more ^{56}Fe from the biofilm ($2.9 \pm 0.2 \times 10^{-7}$ M) in presence of $^{57}\text{FeCl}_3$ than cells grown without environmental Fe or with ^{57}Fe -tannic acid ($1.1 \pm 0.1 \times 10^{-7}$ M and $1.9 \pm 0.3 \times 10^{-7}$ M) for noFe and ^{57}Fe -Tannic acid condition, respectively). Importantly, $^{57}\text{FeCl}_3$ contributed significantly more to biofilm-bound Fe than to intracellular Fe (Fig. 21.C). This experiment demonstrates that the environmental source of Fe has an important impact on the mobilization of biofilm-bound Fe by *B. subtilis*.

Efficiency of bacillibactin to compete with hydroxide and tannic acid for Fe

As shown in figure 21.B, Fe acquisition from the environment was delayed in presence of ^{57}Fe -tannic acid as compared to $^{57}\text{FeCl}_3$ (Fig. 21.C). This delay could result from a slower availability of environmental Fe when present as Fe-Tannic acid as compared to FeCl_3 . Previously, we showed that siderophore production is absolutely required in our experimental conditions to support growth of *B. subtilis* in standing liquid MSgg medium (Rizzi et al., 2019)⁸⁰. Consequently, we hypothesized that the earlier acquisition of environmental ^{57}Fe in the FeCl_3 condition reflect the higher efficiency of bacillibactin, *B. subtilis* siderophore with the highest affinity for Fe, to recruit Fe from Fe-hydroxides (coming from FeCl_3) than Fe-tannic acid. To test this hypothesis, we followed the formation of Fe-bacillibactin complex in presence of 10^{-5} M bacillibactin, the concentration produced by *B. subtilis* during biofilm formation⁸⁰, in a MSgg medium containing 10^{-4} M Fe provided as FeCl_3 or Fe-tannic acid.

As presented in Figure 22, after 4 hours, 40% of Fe was complexed by bacillibactin in the medium containing FeCl₃ for only 15% in the medium containing Fe-tannic acid. This observation confirmed the slower accessibility, for *B. subtilis* siderophore, of Fe-tannic acid compared to Fe-hydroxides.

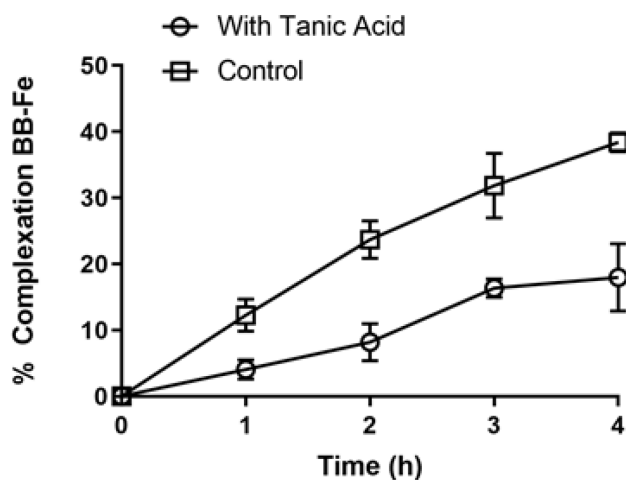


Fig 22. Complexation of Fe by the triscatechol siderophore bacillibactin in presence of FeCl₃ and Fe-tannic acid Formation of Fe-bacillibactin complex, expressed as % of Fe complexed to bacillibactin, in the presence of 10⁻⁵ M Fe-tannic acid (circles) and 10⁻⁵ M FeCl₃ (squares). Complexation was assayed in MiliQ water supplemented with 10⁻⁵ M of bacillibactin

5.2.5. Discussion

Our results show that under static culture conditions, *B. subtilis* biofilms can trap large quantity of Fe in its extracellular matrix. Our data also suggest that Fe complexation in the biofilm results from complex interactions between the various components of the matrix, reflecting the role of chemical interactions between exopolysaccharides and protein components for Fe binding. Since both exopolysaccharides and proteins are required for complete maturation of the biofilm ⁴⁶, the significantly higher sequestration of

Fe by wildtype biofilms, as compared to mutants (Fig. 19.B), could also reflect the importance of the 3D structure of the biofilm for Fe sequestration. More research is required to decipher the role of biofilm chemical composition and physical structure on Fe sequestration.

Accumulation of Fe, and potentially other metals, in biofilm matrix might be widespread in environmental bacteria, as illustrated by similar Fe sequestration reported in biofilms of the Gram-negative *P. aeruginosa*¹⁶. Indeed, since controlling Fe supply in natural habitats is challenging, the presence of Fe close to cells that can be mined under Fe deficiency could help microorganisms to cope with Fe stress.

However, our data show that in absence of environmental (i.e., from outside the biofilm matrix) Fe sources, only a fraction of biofilm-bound Fe is available for uptake, and this amount is insufficient to sustain normal growth. Recent studies reported that Fe in the biofilm can contribute to extracellular electron transport (EET) supporting bacteria metabolism^{84–86}.

Thus, Fe bound to the biofilm seem to assume at least two important functions, a local source of Fe for uptake and an extracellular metabolic function such as EET. Assuming that bacteria need to maintain a minimum pool of Fe in the biofilm for extracellular metabolic function (e.g., EET), we propose a theoretical framework to explain how *B. subtilis* manage environmental and biofilm-bound Fe for Fe uptake (Fig. 23).

In the environment, three sources of Fe could support Fe uptake for growth; available Fe in the biofilm, not required for extracellular metabolism (Fig 23 - E), direct uptake from the environment allowing to preserve Fe stocks in the biofilm for extracellular needs (Fig 23 - B), and uptake of Fe from a biofilm dynamically replenished by environmental Fe (Fig 23 – C and E). Under our experimental conditions, mining biofilm-bound Fe for uptake quickly collide with the need to sustain Fe requirement in the biofilm to support critical metabolic functions (e.g., EET, no Fe condition). Once the small fraction of biofilm-bound Fe available for uptake is used, bacterial growth (Fe uptake) requires the contribution of external sources. In presence of ⁵⁷Fe-tannic acid, bacterial growth can be fully explained by the use of a small fraction of biofilm-bound Fe (similar to the amount used in the noFe condition) followed by the direct uptake of Fe from the environment by cells (23.E then B). Indeed, the low accessibility of ⁵⁷Fe-tannic acid could force cells to acquire Fe locally before accessing the external pool. Environmental ⁵⁷FeCl₃ is more easily accessible, providing an efficient replenishment of the biofilm with environmental ⁵⁷Fe that match or exceed cellular Fe uptake, sustaining both intra and extracellular Fe needs (23.C and E). This is

illustrated by the higher acquisition of ^{56}Fe from the biofilm (Fig. 21.B) and the observed replenishment of the biofilm

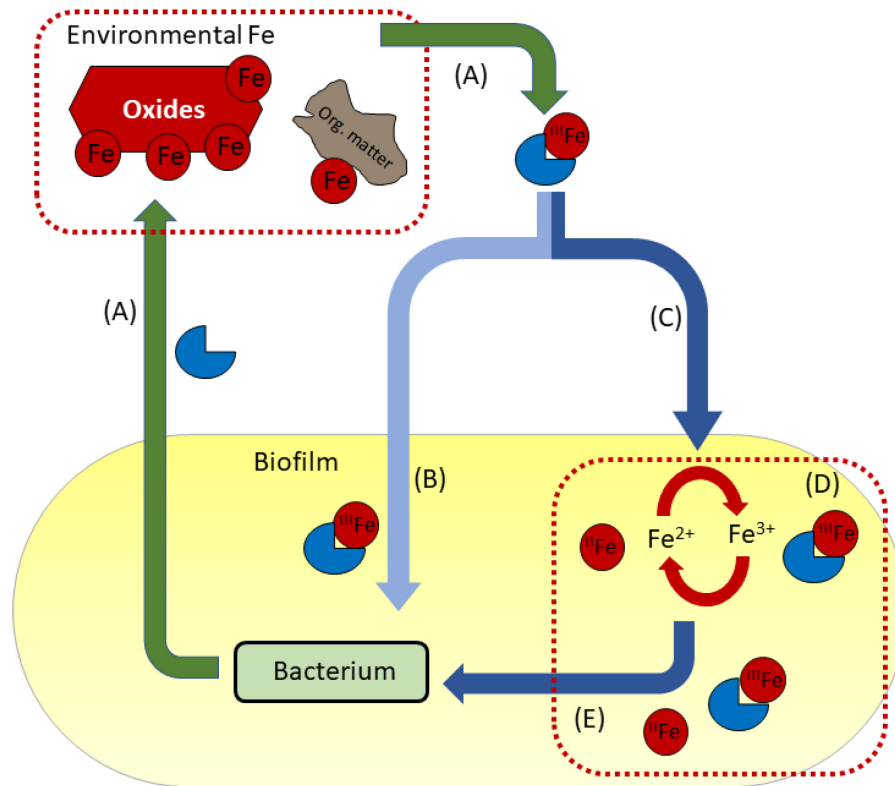


Fig 23. Schematic framework for biofilm-bound and environmental Fe management by *B. subtilis*. Bacteria secrete siderophores in the environment to recruit Fe from natural sources (oxides and organic matter) (A). Siderophore-Fe complexes can be directly taken up by cells (B) and/or contribute to refuel Fe in the biofilm (C). The biofilm contains large amount of Fe (an order of magnitude more than cells), a large fraction of which is used for extracellular metabolic function (e.g., EET) (D) and the rest can be mobilized for uptake (E). The mechanism underpinning the accumulation of Fe in the biofilm and the mobilization of Fe from the biofilm for uptake remain unclear.

with environmental ^{57}Fe in the FeCl_3 condition (Fig 21.C). The mechanisms leading to the replenishment of Fe in the biofilm remain to be fully characterized.

Recently, we reported that siderophore production and biofilm formation are both essential for *B. subtilis* growth and Fe homeostasis in static culture, and that concentrations of bacillibactin in the biofilm and the

supernatant of *B. subtilis* standing cultures are similar⁸⁰. Thus, siderophores could contribute to refuel the biofilm by acting as a shuttle between environmental sources and the biofilm. The faster complexation of Fe from FeCl₃ than Fe-Tannic acid (Fig. 22), result in faster and higher availability of environmental Fe (Fe-siderophore complex) for uptake and biofilm refueling.

Nonetheless, our results along with those of recent studies show that Fe acquisition by biofilm forming bacteria, such as *B. subtilis*, is complex and modulated by intra and extracellular Fe requirement and environmental Fe availability (abundance and chemical form). More research on Fe requirement for extracellular metabolic functions and on the mechanisms underpinning Fe transport to the biofilm and to cells is required to draw a more comprehensive picture of Fe homeostasis in biofilm forming bacteria. The high requirement of biofilm-bound Fe for normal growth observed in this study (Fig. 21) invites for further research on the real function and homeostasis of Fe in the biofilm.

5.2.6 Acknowledgment

The authors thank Olivier Savary for his precious help for the quantification of isotopic iron. This project was supported by the Fond de Recherche du Québec Nature et Technologies through a Partenariat pour l'Innovation grant (SR, JPB), the Canadian Research Chair in boreal biogeochemistry (JPB) and a NSERC discovery grant (PBB).

Conclusion générale :

Cette recherche sur l'homéostasie du fer chez *Bacillus subtilis* a permis de mettre en évidence que le biofilm bactérien n'était pas une simple armure protectrice contre les stress physico-chimiques de l'environnement.

Dans un premier temps, ce travail a permis de montrer que l'interaction entre la production du biofilm et des sidérophores joue un rôle essentiel dans l'acquisition et l'homéostasie du fer par la bactérie *Bacillus subtilis* en culture statique. Considérant que la plupart des microorganismes dans la nature produisent des sidérophores et vivent dans des biofilms, ces résultats plaident la nécessité de développer les recherches sur l'homéostasie métallique en cultures statiques permettant de prendre en compte le biofilm bactérien. Dans un second temps, nos résultats ont montré que le biofilm complexe une grande quantité de fer, et que les interactions entre les composants polysaccharidiques et polypeptidiques de la matrice sont importantes pour cette complexation. La perte d'un de ces deux composants entraînant une perte drastique de cette propriété de complexation. Il serait intéressant à l'avenir de chercher à caractériser avec plus de précision la nature de ces composants. De plus, nos résultats montrent que l'acquisition et l'utilisation du Fe depuis le biofilm sont dépendants des sources extérieures de Fe au biofilm.

Nos résultats ainsi que des résultats récents de la littérature suggèrent que le Fe dans le biofilm aurait au moins deux fonctions ; une source locale de Fe pour la nutrition minérale et un support au métabolisme redox (ATE) extracellulaire (Fig. 24). L'acquisition du Fe depuis le biofilm dépendrait de la capacité de la bactérie à réalimenter le biofilm en Fe depuis le milieu extérieur (Fig. 24 Ω) afin de satisfaire les besoins en Fe pour la nutrition (Fig. 24 ρ) et pour le métabolisme redox matriciel (Fig. 24 β).

L'homéostasie métallique cellulaire est une fonction essentielle de la microbiologie. Les résultats de cette recherche invitent à étendre cette notion d'homéostasie au biofilm et à considérer l'importance de l'**homéostasie matricielle** pour la croissance bactérienne. La figure 24 présente un cadre théorique pour l'homéostasie matricielle défini sur la base des résultats de cette étude et de travaux récents d'autres auteurs. Considérant nos observations précédentes, les sidérophores jouent sans doute un rôle non négligeable dans le processus de transfert du Fe du milieu extérieur vers le biofilm (Ω) qui reste à être caractérisé de manière plus approfondie. Une fois dans le biofilm, l'acquisition du Fe pourrait être réalisée via l'internalisation des complexes Fe^{3+} -sidérophores ou l'internalisation du Fe^{2+} après réduction. Pour l'acquisition du Fe sous forme réduite Fe^{2+} , nous pouvons émettre trois hypothèses concernant les mécanismes possibles d'internalisation du Fe^{2+} (Fig 24)

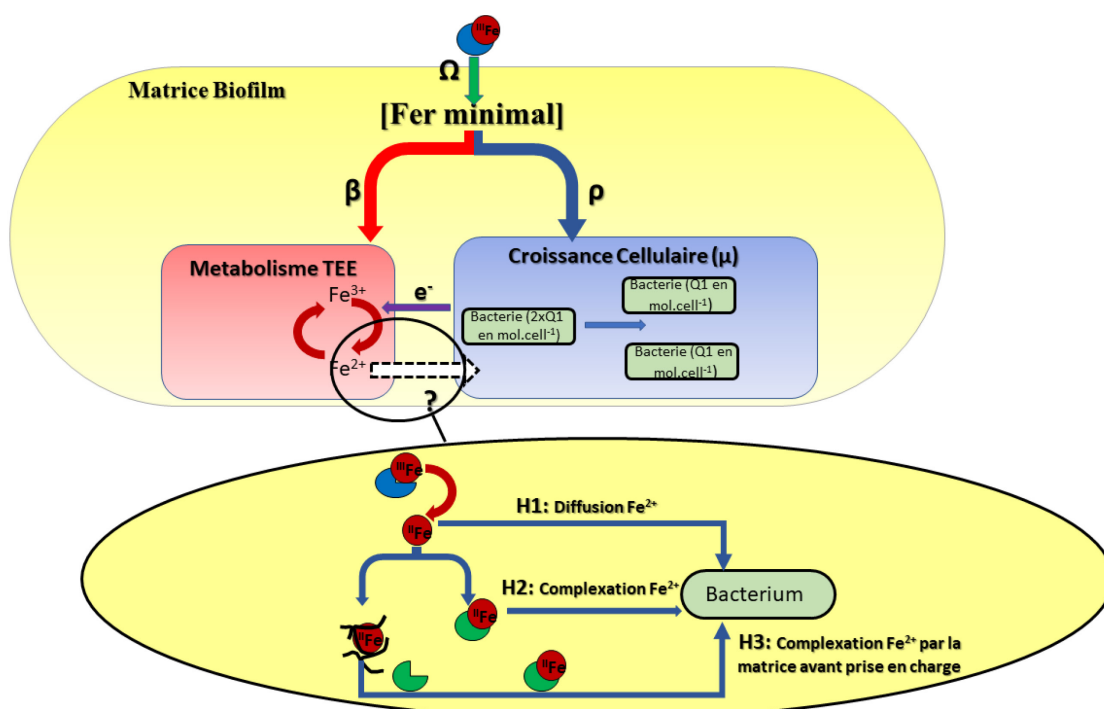


Fig.24. Schémas illustrant les hypothèses sur les processus permettant le maintien de l'homéostasie du Fe dans une culture de *Bacillus subtilis*. Incluant l'homéostasie intracellulaire et matricielle.

La première hypothèse (H1) serait une acquisition directe des ions Fe^{2+} présent dans la matrice du biofilm. Le risque de perte de Fe^{2+} par diffusion en dehors de la matrice extracellulaire anoxique ne peut être exclu. Cependant, le Fe^{2+} pourrait se réoxyder en Fe^{3+} dans le milieu extérieur ou dans une région du biofilm plus riche en dioxygène, ou il pourrait être pris en charge par le sidérophore.

Afin d'éviter une diffusion anarchique du Fe^{2+} très soluble, celui-ci pourrait être complexé par des ligands (seconde hypothèse, H2) contribuant ainsi à l'acquisition, mais également au contrôle du rapport $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ important pour son processus TEE. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'une molécule présentant une haute affinité pour le Fe^{2+} , la proferrosamine A, a été décrite chez *Pseudomonas roseus fluorescens*. Vande Woestyne et al ⁸⁷ ont montré que cette molécule est indispensable pour l'acquisition de fer par les sidérophores chez *Pseudomonas roseus fluorescens* et que sa production augmentait avec la raréfaction du fer et de l'oxygène.

Enfin, une troisième hypothèse (H3) ferait intervenir une étape intermédiaire entre la réduction du fer (III) en fer (II) et la prise en charge par une molécule tierce. Cette étape serait la complexation locale du Fe^{2+} par la matrice extracellulaire. Cette hypothèse permettrait d'expliquer la présence de zone d'enrichissement de fer (II) localisé spatialement dans des biofilms ⁵¹ (Fig. 8). L'existence d'un couple

de molécules complexant le Fe^{2+} et le Fe^{3+} contribuant à maintenir des concentrations adéquates en Fe à proximité des cellules pour soutenir le métabolisme redox extracellulaire ne peut être exclue.

Le devenir du fer (II) à l'intérieur du biofilm n'est pas la seule question en suspens. En effet, il reste de nombreux points à éclaircir avant de pouvoir appliquer ce modèle théorique à des questions plus pratiques dans les domaines de la pharmaceutique ou de l'environnemental. Il est primordial avant toute chose de confirmer le devenir des sidérophores dans la matrice. Notamment si ceux-ci sont bien capables d'être internalisés directement par les cellules ou s'ils sont majoritairement décomplexés afin d'alimenter la réserve de fer intramatriciel. La bactérie prélevant alors le fer dans cette réserve.

Dans un contexte naturel, les biofilms étant multiespèces, il est également nécessaire de vérifier la validité de nos observations pour d'autres espèces bactériennes. Je recommanderais pour cela d'effectuer des études avec deux espèces bactériennes vivant dans un même biofilm et possédant une mutation pour être constitutivement fluorescentes, mais pas dans les mêmes longueurs d'onde. Ceci permettant d'effectuer leur séparation par trie cellulaire grâce à la cytométrie de flux et donc d'employer les méthodes décrites dans cette étude avec un minimum de modifications. De plus, comme *Bacillus subtilis* utilise le fer comme accepteur terminal d'électrons en lieu et place de l'oxygène, on peut supposer que les processus observés peuvent être favorisés dans les milieux pauvres en oxygène. Ainsi, les biofilms pourraient être de formidables microcosmes favorisant les réactions biologiques défavorisées par la présence d'oxygène, comme la fixation d'azote. Il serait alors intéressant d'étudier si ces mécanismes sont plus ou moins présents dans le contexte de biofilms fixateurs d'azote. Enfin, un dernier axe de recherche pourrait être d'améliorer ce modèle des interactions sidérophores-biofilms en intégrant la structure tridimensionnelle du biofilm qui n'est pas pris en compte dans nos études, car nous nous sommes intéressés au biofilm dans sa globalité. En effet, on peut imaginer que l'internalisation des sidérophores pourrait être plus présente à la surface du biofilm alors que la décomplexation dans la matrice pour l'alimentation de la réserve matricielle pourrait être plus présente dans la profondeur du biofilm pauvre en oxygène.

RÉFÉRENCES ET NOTES

- (1) Cairo, G.; Bernuzzi, F.; Recalcati, S. A precious metal: iron, an essential nutrient for all cells metal,. *Genes Nutr.* **2006**, *1* (1), 25–40.
- (2) Balk, J.; Schaedler, T. A. Iron Cofactor Assembly in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2014**, No. 65, 125–153.
- (3) Wedepohl, K. H. INGERSON LECTURE The Composition of the Continental Crust . *Geochim. Cosmochim. Acta* **1995**, *59* (7), 1217–1232.
- (4) Andrews, S. C.; Robinson, A.; Rodríguez-Quñones, F. Bacterial Iron Homeostasis. **2003**, 27.
- (5) Kehl-fie, T. E.; Skaar, E. P. Nutritional Immunity beyond Iron : A Role for Manganese and Zinc. *Curr. Opin. Chem .Biol.* **2010**, *14* (2), 218–224.
- (6) Aisen, P.; Listowsky, I. Iron Transport and Storage Proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **1980**, *49*, 357–393.
- (7) Wang, T. P.; Quintanar, L.; Severance, S.; Solomon, E. I.; Kosman, D. J. Targeted Suppression of the Ferroxidase and Iron Trafficking Activities of the Multicopper Oxidase Fet3p from *Saccharomyces Cerevisiae*. *J. Biol. Inorg.* **2003**, *8*, 611–620.
- (8) Kwok, E. Y.; Severance, S.; Kosman, D. J. Evidence for Iron Channeling in the Fet3p-Ftr1p High-Affinity Iron Uptake Complex in the Yeast Plasma Membrane. *Biochemistry* **2006**, *45*, 6317–6327.
- (9) Neilands, J. . Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds Siderophores. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26723–26726
- (10) Liermann, L. J.; Kalinowski, B. E.; Brantley, S. L.; Ferry, J. G. Role of Bacterial Siderophores in Dissolution of Hornblende. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2000**, *64* (4), 587–602.
- (11) Kraemer, S. M. Iron Oxide Dissolution and Solubility in the Presence of Siderophores. *Aquat. Sci. - Res. Across Boundaries* **2004**, *66* (1), 3–18.
- (12) Boukhalfa, H.; Crumbliss, A. L. Chemical Aspects of Siderophore Mediated Iron Transport. *BioMetals* **2002**, *15*, 325–339.
- (13) Albrecht-Gary, A.; Crumbliss, A. Coordination chemistry of siderophores: Thermodynamics and kinetics of iron chelation and release *Met Ions Biol Syst.* **1998**, *35*, 239–327.
- (14) Flemming, H.; Wingender, J. The Biofilm Matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8* (9), 623–633.
- (15) Papageorgiou, S. K.; Kouvelos, E. P.; Favvas, E. P.; Sapalidis, A. A.; Romanos, G. E.; Katsaros, F. K. Metal-Carboxylate Interactions in Metal-Alginate Complexes Studied with FTIR Spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345* (4), 469–473.
- (16) Yu, S.; Wei, Q.; Zhao, T.; Guo, Y.; Ma, L. Z. A Survival Strategy for *Pseudomonas Aeruginosa* That Uses Exopolysaccharides To Sequester and Store Iron To Stimulate Psl-Dependent Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82* (21), 6403–6413.
- (17) Costerton, J. W.; Cheng, K. J.; Geesey, G. G.; Ladd, T. I.; Nickel, J. C.; Dasgupta, M.; Marrie, T. J. Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **1987**, *41* (1), 435–464.

- (18) Kolodkin-gal, I.; Elsholz, A. K. W.; Muth, C.; Girguis, P. R.; Kolter, R.; Losick, R. Respiration Control of Multicellularity in *Bacillus Subtilis* by a Complex of the Cytochrome Chain with a Membrane-Embedded Histidine Kinase. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 887–899.
- (19) Banin, E.; Vasil, M. L.; Greenberg, E. P. Iron and *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (31), 11076–11081.
- (20) Musk, D. J.; Banko, D. A.; Hergenrother, P. J. Iron Salts Perturb Biofilm Formation and Disrupt Existing Biofilms of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Chem. Biol.* **2005**, *12* (7), 789–796.
- (21) Reid, D. W.; O'May, C.; Roddam, L. F.; Lamont, I. L. Chelated Iron as an Anti-*Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Therapeutic Strategy. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *106* (3), 1058.
- (22) Lin, M. H.; Shu, J. C.; Huang, H. Y.; Cheng, Y. C. Involvement of Iron in Biofilm Formation by *Staphylococcus Aureus*. *PLoS One* **2012**, *7* (3), 3–9.
- (23) Baichoo, N.; Helmann, J. D. Recognition of DNA by Fur : A Reinterpretation of the Fur Box Consensus Sequence. *J. Bacteriol.* **2002**, *184* (21), 5826–5832.
- (24) Baichoo, N.; Wang, T.; Ye, R.; Helmann, J. D. Global Analysis of the *Bacillus Subtilis* Fur Regulon and the Iron Starvation Stimulon. *Mol. Microbiol.* **2002**, *45* (6), 1613–1629.
- (25) Troxell, B.; Hassan, H. M. Transcriptional Regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in Pathogenic Bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2013**, *3* (59), 1–13.
- (26) Hider, R. C.; Kong, X. Chemistry and Biology of Siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 637–657.
- (27) Miethke, M.; Schmidt, S.; Marahiel, M. A. The Major Facilitator Superfamily-Type Transporter YmfE and the Multidrug-Efflux Activator Mta Mediate Bacillibactin Secretion in *Bacillus Subtilis* □. *J. Bacteriol.* **2008**, *190* (15), 5143–5152.
- (28) Lesuisse, E.; Simon-Casteras, M.; Labbe, P. Siderophore-Mediated Iron Uptake in *Saccharomyces Cerevisiae* : The SIT1 Gene Encodes a Ferrioxamine B Permease That Belongs to the Major Facilitator Superfamily. *Microbiology* **1998**, No. 144, 3455–3462.
- (29) Yun, C. W.; Ferea, T.; Rashford, J.; Ardon, O.; Brown, P. O.; Botstein, D.; Kaplan, J.; Philpott, C. C. Desferrioxamine-Mediated Iron Uptake in *Saccharomyces Cerevisiae*. Evidence for Two Pathways of Iron Uptake. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (14), 10709–10715.
- (30) Miethke, M.; Marahiel, M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *71* (3), 413–451.
- (31) Abergel, R. J.; Zawadzka, A. M.; Hoette, T. M.; Raymond, K. N. Enzymatic Hydrolysis of Trilactone Siderophores: Where Chiral Recognition Occurs in Enterobactin and Bacillibactin Iron Transport. *J Am Chem Soc.* **2009**, *131* (35), 12682–12692.
- (32) Takeru, I.; Neilands, J. . Products of “Low-Iron Fermentation” with *Bacillus Subtilis*: Isolation, Characterization and Synthesis of 2,3-Dihydroxybenzoylglycine. *J Am Chem Soc.* **1958**, *80* (17), 4645–4647.
- (33) Chipperfield, J. R.; Ratledge, C. Salicylic Acid Is Not a Bacterial Siderophore : A Theoretical Study. *BioMetals* **2000**, *13*, 165–168.

- (34) May, J. J.; Wendrich, T. M.; Marahiel, M. A. The Dhb Operon of *Bacillus Subtilis* Encodes the Biosynthetic Template for the Catecholic Siderophore 2,3-Dihydroxybenzoate-Glycine-Threonine Trimeric Ester Bacillibactin. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (10), 7209–7217.
- (35) Hotta, K.; Kim, C. Y.; Fox, D. T.; Koppisch, A. T. Siderophore-Mediated Iron Acquisition in *Bacillus Anthracis* and Related Strains. *Microbiology* **2010**, 156 (7), 1918–1925.
- (36) Loomis, L. D.; Raymond, K. N. Solution Equilibria of Enterobactin and Metal-Enterobactin Complexes. *Inorg. Chem* **1991**, 30 (5), 906–911.
- (37) Ollinger, J.; Song, K.; Antelmann, H.; Hecker, M.; Helmann, J. D. Role of the Fur Regulon in Iron Transport In. *Society* **2006**, 188 (10), 3664–3673.
- (38) Simain, F.; Rompen, E.; Heinen, E. Biofilms Bactériens et Médecine Dentaire. *Rev Med Liège* **2010**, 65 (10), 569–573.
- (39) Branda, S. S.; Gonza, E.; Ben-yehuda, S.; Losick, R.; Kolter, R. Fruiting Body Formation by *Bacillus Subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, 98 (20), 11621–11626.
- (40) Grau, R. R.; De Oña, P.; Kunert, M.; Leñini, C.; Gallegos-Monterrosa, R.; Mhatre, E.; Vileta, D.; Donato, V.; Hölscher, T.; Boland, W.; et al. A Duo of Potassium-Responsive Histidine Kinases Govern the Multicellular Destiny of *Bacillus Subtilis*. *MBio* **2015**, 6 (4), 1–16.
- (41) Shemesh, M.; Chaia, Y. A Combination of Glycerol and Manganese Promotes Biofilm Formation in *Bacillus Subtilis* via Histidine Kinase KinD Signaling. *J. Bacteriol.* **2013**, 195 (12), 2747–2754.
- (42) López, D.; Fischbach, M. A.; Chu, F.; Losick, R.; Kolter, R. Structurally Diverse Natural Products That Cause Potassium Leakage Trigger Multicellularity in *Bacillus Subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106 (1), 280–285.
- (43) Beauregard, P. B.; Chai, Y.; Vlamakis, H.; Losick, R.; Kolter, R. *Bacillus Subtilis* Biofilm Induction by Plant Polysaccharides. **2013**, 1621–1630.
- (44) Chen, Y.; Shugeng, C.; Yunrong, C.; Jon, C.; Roberto, K.; Jian-hua, G.; Losick, R. A *Bacillus Subtilis* Sensor Kinase Involved in Triggering Biofilm Formation on the Roots of Tomato Plants. *Mol. Microbiol.* **2012**, 85 (3), 418–430.
- (45) Branda, S. S.; González-Pastor, J. E.; Dervyn, E.; Ehrlich, S. D.; Losick, R.; Kolter, R. Genes Involved in Formation of Structured Multicellular Communities by *Bacillus Subtilis*. *J. Bacteriol.* **2004**, 186 (12), 3970–3979..
- (46) Branda, S. S.; Chu, F.; Kearns, D. B.; Losick, R.; Kolter, R. A Major Protein Component of the *Bacillus Subtilis* Biofilm Matrix. **2006**, 59 (4), 1229–1238.
- (47) Dogsa, I.; Brložnik, M.; Stopar, D.; Mandić-Mulec, I. Exopolymer Diversity and the Role of Levan in *Bacillus Subtilis* Biofilms. *PLoS One* **2013**, 8 (4), 2–11.
- (48) Roux, D.; Cywes-Bentley, C.; Zhang, Y. F.; Pons, S.; Konkol, M.; Kearns, D. B.; Little, D. J.; Howell, P. L.; Skurnik, D.; Pier, G. B. Identification of Poly-N-Acetylglucosamine as a Major Polysaccharide Component of the *Bacillus Subtilis* Biofilm Matrix. *J. Biol. Chem.* **2015**, 290 (31), 19261–19272.
- (49) Szwengiel, A.; Wiesner, M. Effect of Metal Ions on Levan Synthesis Efficiency and Its Parameters by Levansucrase from *Bacillus Subtilis*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, 128, 237–243.

- (50) Pero, J.; Sloma, A. *Protease. In: Bacillus Subtilis and Other Gram Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*, American S.; Sonenshein, A. ., Hoch, J. A., Losick, R., Eds.; Washington,DC, 1993.
- (51) Dynes, J. J.; Tyliszczak, T. Speciation and Quantitative Mapping of Metal Species in Microbial Biofilms Using Scanning Transmission X-Ray Microscopy. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (5), 1556–1565.
- (52) Droop, M. Some thoughts on nutrient limitation in algae *J. Phycol.* **1973**, *9* (3), 264–272.
- (53) Miethke, M.; Klotz, O.; Linne, U.; May, J. J.; Beckering, C. L.; Marahiel, M. A. Ferri-Bacillibactin Uptake and Hydrolysis in *Bacillus Subtilis*. *Mol. Microbiol.* **2006**, *61* (6), 1413–1427.
- (54) Brand, L. E. Minimum Iron Requirements of Marine Phytoplankton and the Implications for the Biogeochemical Control of New Production. *Limnol. Oceanogr.* **1991**, *36* (8), 1756–1771.
- (55) Luengen, A. C.; Raimondi, P. T.; Flegal, A. R. Contrasting Biogeochemistry of Six Trace Metals during the Rise and Decay of a Spring Phytoplankton Bloom in San Francisco Bay. *Limnol. Oceanogr.* **2007**, *52* (3), 1112–1130.
- (56) Tang, D.; Morel, F.; M., M. Distinguishing between Cellular and Fe-Oxide-Associated Trace Elements in Phytoplankton. **2006**, *98*, 18–30.
- (57) Frausto Da Silva, J. J. R.; Williams, R. J. P.; .. *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*; Clarendon Press, Ed.; Oxford University Press, 1991.
- (58) Kabata-Pendias. *Trace Elements in Soils and Plants*, Fourth Edi.; CRC Press, 2001.
- (59) Schneider, W. Hydrolysis of Iron(III)...Chaotic Olation Versus Nucleation. *Comments Inorg. Chem.* **1984**, *3* (4), 205–223.
- (60) Cheah, S.-F.; Kraemer, S. M.; Cervini-Silva, J.; Sposito, G. Steady-State Dissolution Kinetics of Goethite in the Presence of Desferrioxamine B and Oxalate Ligands: Implications for the Microbial Acquisition of Iron. *Chem. Geol.* **2003**, *198* (1–2), 63–75.
- (61) Budzikiewicz, H.; Wandersman, C.; O'Brian, M. R.; Fabiano, E.; Brickman, T. J.; Armstrong, S. K.; Payne, S. M.; Mey, A. R.; Franza, T.; Expert, D.; et al. *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms Book*; Cornelis, P., Andrews, S. C., Eds.; Caister Academic Press., 2010.
- (62) Kraemer, S. M. Iron Oxide Dissolution and Solubility in the Presence of Siderophores. *Aquat. Sci.* **2004**, *66* (1), 3–18.
- (63) O'May, C. Y.; Sanderson, K.; Roddam, L. F.; Kirov, S. M.; Reid, D. W.; Reid, D. W. Iron-Binding Compounds Impair *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Formation , Especially under Anaerobic Conditions. **2009**, No. 2009, 765–773.
- (64) Pelchovich, G.; Omer-Bendori, S.; Gophna, U. Menaquinone and Iron Are Essential for Complex Colony Development in *Bacillus Subtilis*. *PLoS One* **2013**, *8* (11), 1–14.
- (65) Grandchamp, G. M.; Caro, L.; Shank, E. A. Pirated Siderophores Promote Sporulation in *Bacillus Subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, No. March, AEM.03293-16.
- (66) Cutting, S.; Harwood, C. . *Molecular Biological Methods for Bacillus*; Harwood, C. ., Cutting, S. ., Eds.; John Wiley and Sons Ltd, 1990.

- (67) Yasbin, R. E.; Young, F. E. Transduction in *Bacillus Subtilis* by Bacteriophage SPP1. *J. Virol.* **1974**, *14* (6), 1343–1348.
- (68) Vlamakis, H.; Aguilar, C.; Losick, R.; Kolter, R. Control of Cell Fate by the Formation of an Architecturally Complex Bacterial Community. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 945–953.
- (69) Darnajoux, R.; Constantin, J.; Miadlikowska, J.; Lutzoni, F.; Bellenger, J. P. Is Vanadium a Biometal for Boreal Cyanolichens ? *New Phytol.* **2014**, 765–771.
- (70) Merz, K. ; Fink, J. Synthese Einiger β -Aryl- β -Methoxy-Äthylamine. *Arch Pharm* **1956**, *289* (7), 347–358.
- (71) Chimiak, A.; Neilands, J. . Lysine Analogues of Siderophores. In *Structure and Bonding*; Springer, 1984; pp 89–96.
- (72) Tortell, P. D.; Maldonado, M. T.; Granger, J.; Priece, N. M. Marine Bacteria and Geochemical Cycling of Iron in the Oceans. *FEMS Microbiol. Ecol.* **1999**, *29*, 1–11.
- (73) Völker, C.; Wolf-Gladrow, D. A. Physical Limits on Iron Uptake Mediated by Siderophores or Surface Reductases. *Mar. Chem.* **1999**, *65* (3–4), 227–244.
- (74) Powell, P. E.; Cline, G. R.; Reid, C. P. P.; Szaniszlo, P. J. Occurrence of Hydroxamate Siderophore Iron Chelators in Soils. *Nature.* 1980, pp 833–834.
- (75) Stewart, P. S.; Franklin, M. J. Physiological Heterogeneity in Biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6* (3), 199–210.
- (76) Prindle, A.; Liu, J.; Asally, M.; Ly, S.; Garcia-Ojalvo, J.; Suel, G. M.; Süel, G. M. Ion Channels Enable Electrical Communication in Bacterial Communities. *Nature* **2015**, *527* (7576), 59–63.
- (77) Bellenger, J. P.; Wichard, T.; Xu, Y.; Kraepiel, A. M. L. Essential Metals for Nitrogen Fixation in a Free-Living N₂-Fixing Bacterium: Chelation, Homeostasis and High Use Efficiency. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13* (6), 1395–1411.
- (78) Mcrose, D. L.; Baars, O. Siderophore Production in *Azotobacter Vinelandii* in Response to Fe- , Mo- and V-Limitation. **2017**, *19*, 3595–3605.
- (79) Patriquin, G. M.; Banin, E.; Gilmour, C.; Tuchman, R.; Greenberg, E. P.; Poole, K. Influence of Quorum Sensing and Iron on Twitching Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2008**, *190* (2), 662–671.
- (80) Rizzi, A.; Roy, S.; Bellenger, J.; Beauregard, P. B. Iron Homeostasis in *Bacillus Subtilis* Requires Siderophore Production and Biofilm Formation. **2019**, *85* (3), 1–10.
- (81) Miethke, M.; Kraushaar, T.; Marahiel, M. A. Uptake of Xenosiderophores in *Bacillus Subtilis* Occurs with High Affinity and Enhances the Folding Stabilities of Substrate Binding Proteins. *FEBS Lett.* **2013**, *587* (2), 206–213.
- (82) Hu, Z.; Hidalgo, G.; Houston, P. L.; Hay, A. G.; Shuler, M. L.; Ghiorse, W. C.; Lion, L. W. Determination of Spatial Distributions of Zinc and Active Biomass in Microbial Biofilms by Two-Photon Laser Scanning Microscopy. **2005**, *71* (7), 4014–4021.
- (83) Zhiqiang, H.; Jing, J.; Héctor D, A.; Paul L, H.; Anthony G, H.; William C, G.; Michael L, S.; Gabriela, H.; Leonard W, L. Spatial Distributions of Copper in Microbial Biofilms by Scanning

Electrochemical Microscopy. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41* (3), 936–941.

- (84) Keogh, D.; Lam, N.; Doyle, L. E.; Matysik, A.; Pavagadhi, S.; Umashankar, S.; Williams, R. B. H.; Marsili, E.; Kline, A. Crossm Extracellular Electron Transfer Powers *Enterococcus Faecalis*. *MBio* **2018**, *9* (2), 1–17.
- (85) Li, S.; Li, L.; Qu, Q.; Kang, Y.; Zhu, B.; Yu, D.; Huang, R. Biointerfaces Extracellular Electron Transfer of *Bacillus Cereus* Biofilm and Its Effect on the Corrosion Behaviour of 316L Stainless Steel. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *173* (September 2018), 139–147.
- (86) Qin, Y.; He, Y.; She, Q.; Larese-casanova, P.; Li, P.; Chai, Y. Heterogeneity in Respiratory Electron Transfer and Adaptive Iron Utilization in a Bacterial Biofilm. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–12.
- (87) Woestyne, M. Vande; Bruyneel, B.; Mergeay, M. A. X.; Verstraetel, W. The Fe²⁺ + Chelator Profferrorosamine A Is Essential for the Siderophore-Mediated Uptake of Iron by *Pseudomonas Roseus Fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57* (4), 949–954.

ANNEXE : INFORMATION COMPLEMENTAIRES DE DE RIZZI ET AL 2019 ⁸⁰

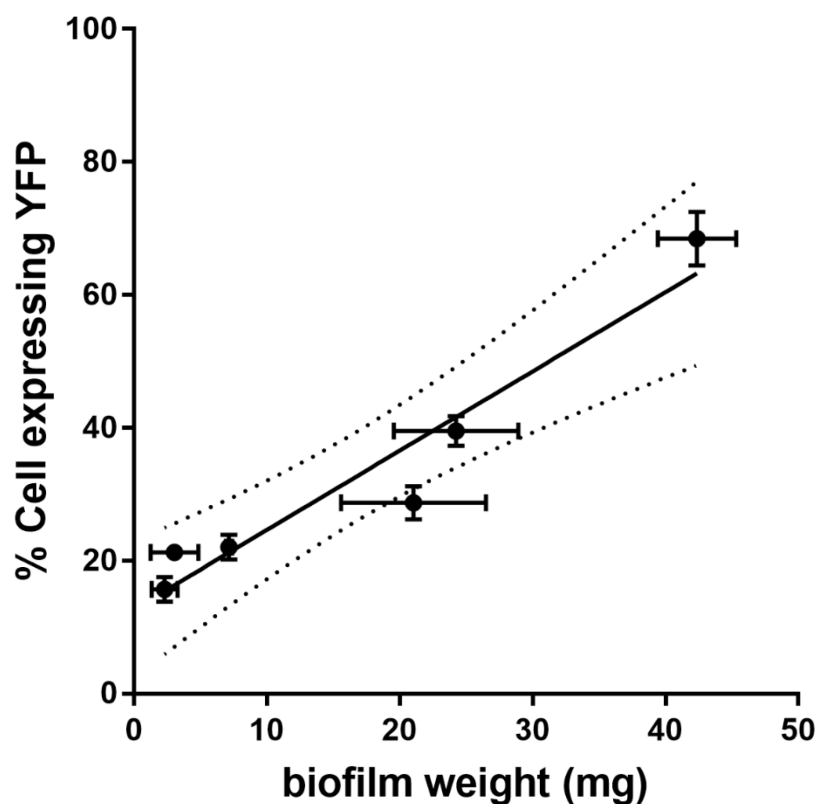


Fig. Annexe 1. Corrélation linéaire entre le poids sec du biofilm bactérien et l'expression du rapporteur P_{tapA} -yfp.

Tirée du sup. infos de Rizzi et al. 2019 ⁸⁰

<S9.Linear correlation between biofilm dry weight and expresseion of the P_{tapA} -yfp reporter in MSgg + $10^{-4}M$ MFe. The black line represents linear regression with a $r^2 = 0.93$.The dashed lines represent 95% CI.>

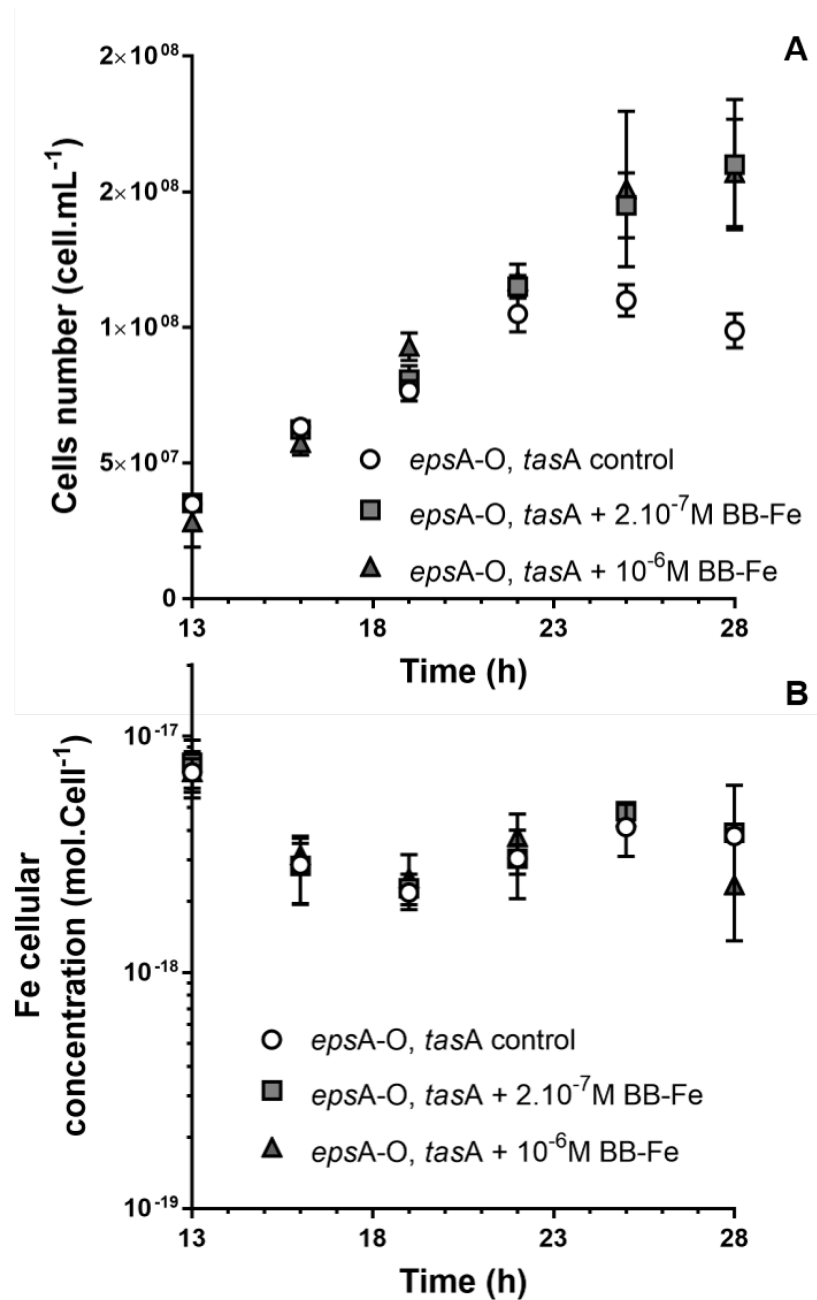


Fig. annexe 2. Croissance et variation des quotas intracellulaires en fer du double mutant *epsA-O, tasA* en absence et présence de BB-Fe

Tire du sup.infos de Rizzi et al. 2019 ⁸⁰

<S8. Growth (A) and intracellular iron quotas (B) of *epsA-O tasA* mutant in the presence and absence of iron-bacillibactin complex>

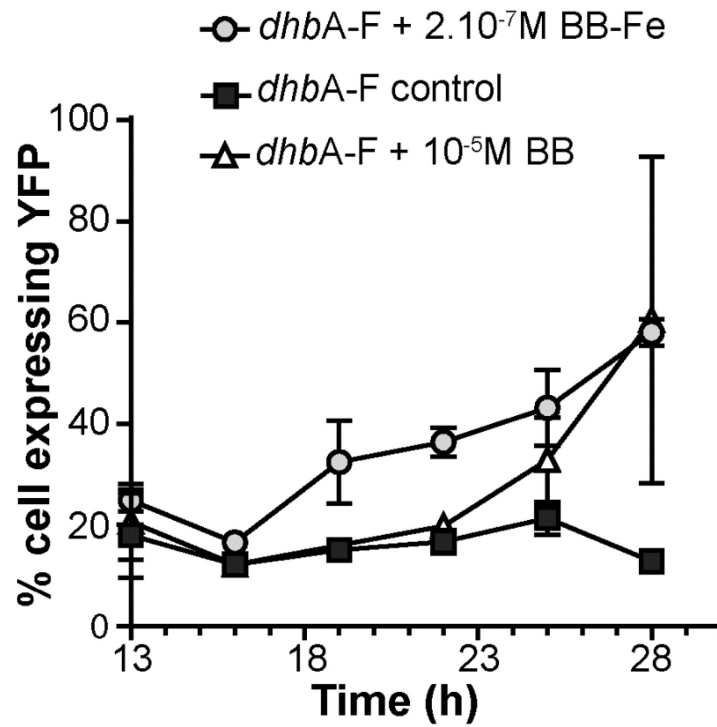


Fig. annexe 3. Induction du Biofilm du mutant *dhbA-F* en présence ou absence de BB ou BB-Fe
Tire du sup. infos de Rizzi et al. 2019⁸⁰

<S7 Induction of biofilm by the *dhba-F* mutant in presence of 10^{-5} bacillibactin (white triangles), of 2×10^{-7} bacillibactin-Fe (gray circles) or in absence (black squares) of bacillibactin. The strain was grown in at 30°C in MSgg medium supplemented with 10^{-4} M FeCl_3 >

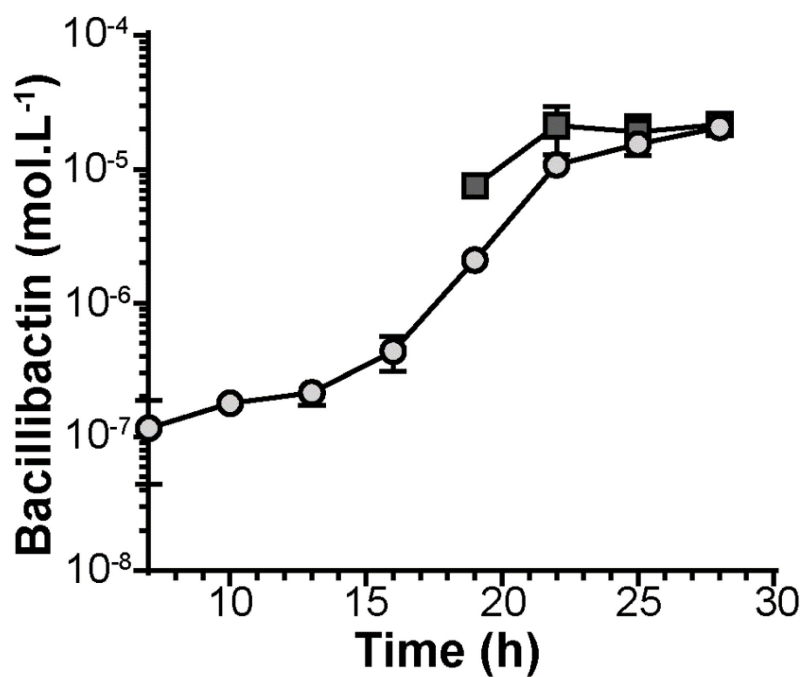


Fig. annexe 4. Concentration de BB dans le biofilm et le surnageant de *B. subtilis* au cours d'une croissance.

Tire du sup. infos de Rizzi et al. 2019 ⁸⁰

<S6. Concentration of bacillibactin (mol.L⁻¹) in supernatant (circles) and biofilm (squares) of *B. subtilis* wildtype during growth in a MSgg medium supplemented with 10⁻⁴ M FeCl₃ at 30°C>

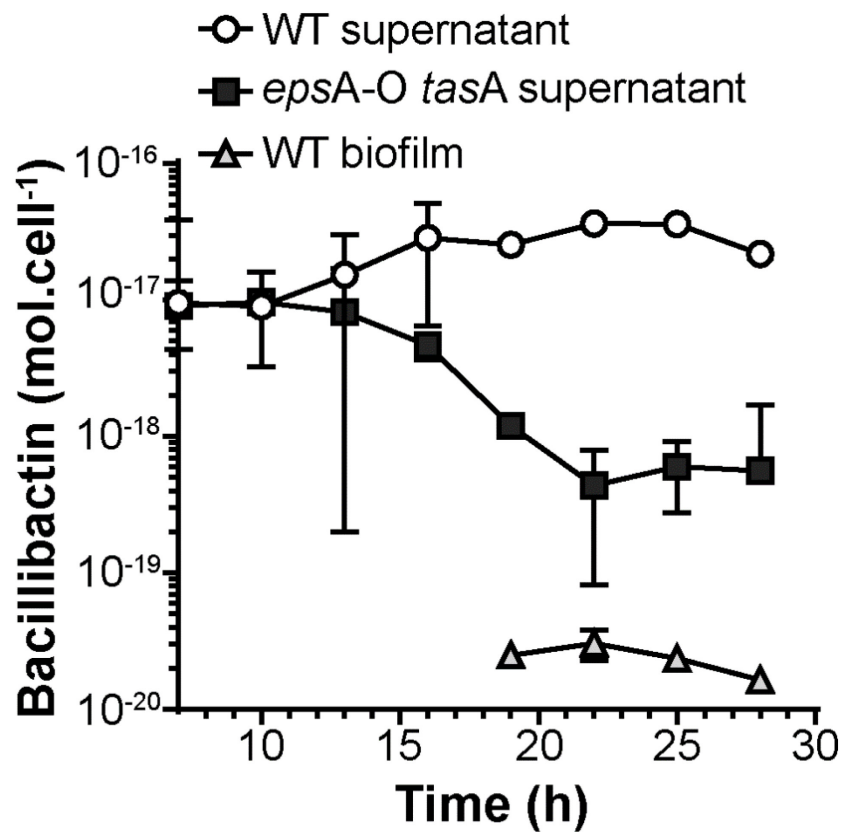


Fig. annexe 5. Production de BB dans le biofilm et le surnageant de *B.subtilis* WT et du double mutant *epsA-O tasA* au cours d'une croissance.

Tire du sup. infos de Rizzi et al. 2019 ⁸⁰

<S5.Production of bacillibactin (mol.cell⁻¹) by *B. subtilis* WT and *epsA-O tasA* mutant during growth in MSgg supplemented with 10⁻⁴ M FeCl₃ at 30°C>

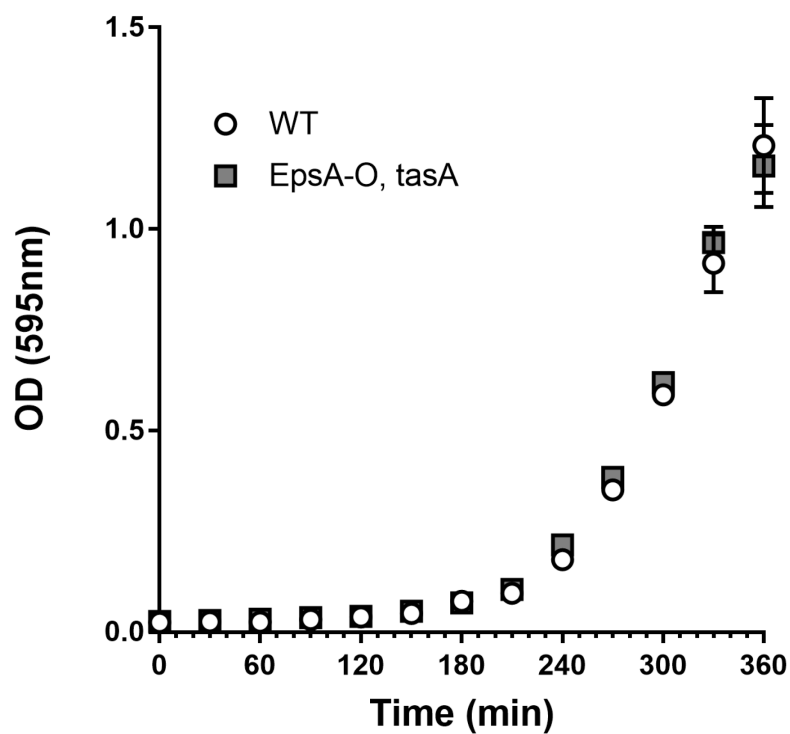


Fig. annexe 6. Croissance de *B.subtilis* WT et du double mutant *epsA*-O, *tasA* sous d'agitation.
Tire du sup. infos de Rizzi et al. 2019 ⁸⁰

<S4. Growth of *Bacillus subtilis* WT and *epsA*-O *tasA* mutant in shaken (150 rpm) liquid MSgg medium (10-4M FeCl3 and at 30°C).>

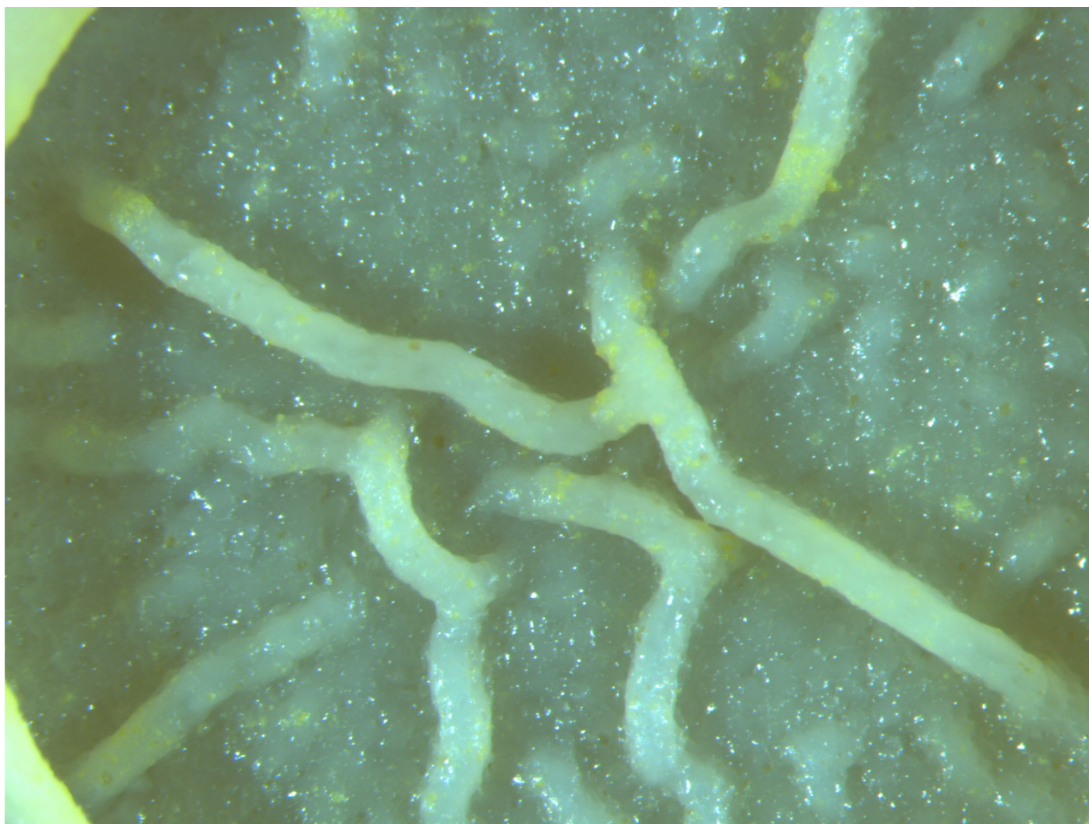


Fig. annexe 7. Photos d'un biofilm de *bacillus subtilis* sur surface solide

Molécules	HLB (%)	HLB acide (%)	C18 (%)	C18 acide (%)
BB	101 ± 8,42	67,3 ± 3,52	30,1 ± 3,45	11,73 ± 6,69
DHBA	98,9 ± 2,82	84,9± 3,67	39,9 ± 7,21	63,7 ± 8,27

Fig. annexe 8. Tableau des pourcentages de recouvrement des cartouches SPE lors de l'extraction des sidérophores

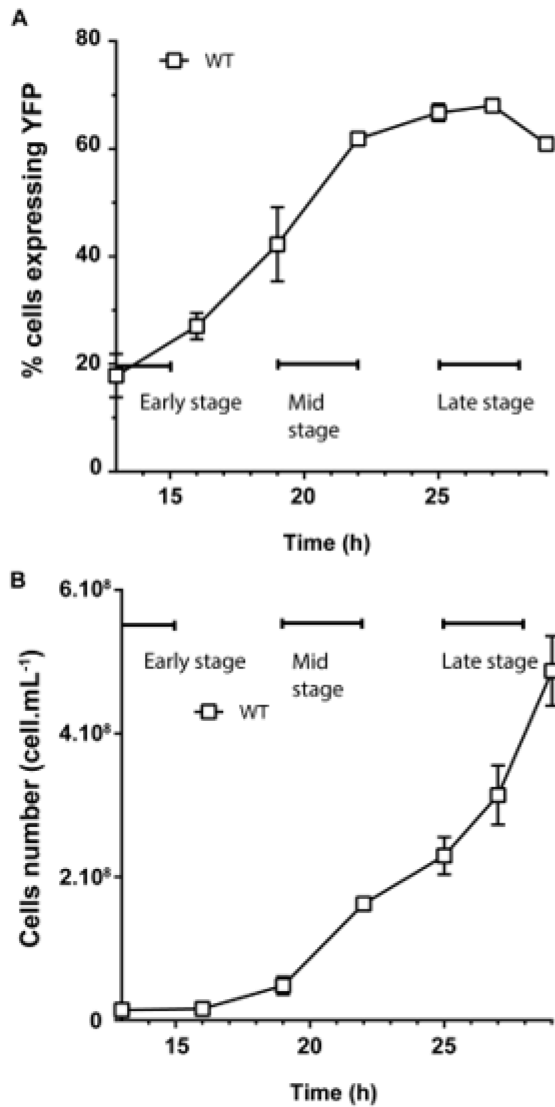


Fig. annexe 9. Croissance et induction du biofilm de *B.subtilis* WT.

Tire du sup. infos de Rizzi et al. 2019 ⁸⁰

<S2. Biofilm induction (A) and growth (B) of *B. subtilis* 3610 $P_{\text{tapA}}\text{-yfp}$ grown at 30°C in a MSgg medium supplemented with 10^{-4} M FeCl_3 (n = 3). Early stage is defined before Biofilm apparition, and late stage after biofilm is well established).>

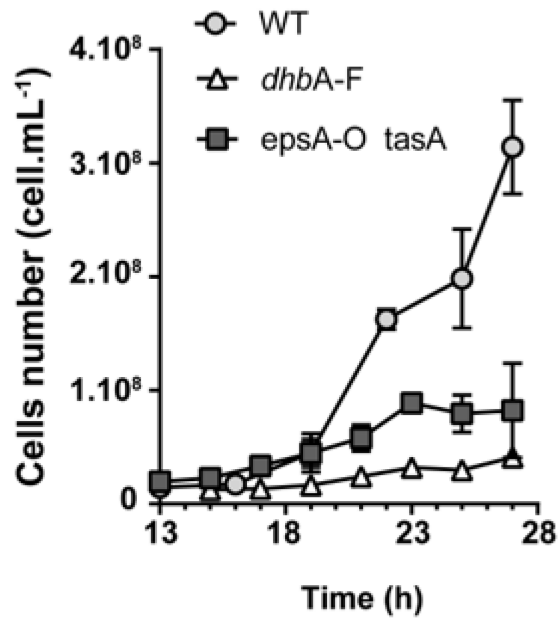


Fig. annexe 10. Croissance de *B.subtilis* WT et des mutants *dhbA-F* et *epsA-O tas A* dans une culture Msgg statique à 30°C

Tire du sup. infos de Rizzi et al. 2019 ⁸⁰

<S3 Growth of *B. subtilis* WT (grey circle), mutant *epsA-O tasA* (Dark-grey square) and mutant *dhbA-F* (white triangle) in a MSgg medium supplemented with 10⁻⁴ M FeCl₃ at 30°C. Phosphorus quantification was used as a proxy for cell quantification (Fig S1). Results are the mean of the three biological replicates and error bars represent standard deviation>